

**ETABLIERUNG EINES ENZYM IMMUNO ASSAYS
UND SEINE ANWENDUNG ZUR QUANTIFIZIERUNG
VON SERUMAMYLOID - PROTEIN A**

HANS WOLFGANG STOLLE

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0053

ETABLIERUNG EINES ENZYM IMMUNO ASSAYS
UND SEINE ANWENDUNG ZUR QUANTIFIZIERUNG
VON SERUMAMYLOID-PROTEIN A

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Hans Wolfgang Stolle
aus
Günzburg

1986

1. Gutachter : Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Schwarzfischer
2. Gutachter : Prof. Dr. W. Gutensohn
3. Sondergutachter : Priv. Doz. Dr. med. R. P. Linke

Tag der mündlichen Prüfung : 8.7.1986

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

- 1. THESE
- 2. THESE
- 3. THESE
- 4. THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

THESE

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	Seite	5
1. EINLEITUNG		7
2. EINFÜHRUNG IN DEN ELISA		9
1. Geschichtliche Entwicklung		9
2. Testprinzipien		10
2.1 Enzym-Inhibitionsassay (EIA)		10
2.2 Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode (ELISA)		12
2.3 Antigen-Antikörper-Sandwich-Methode		12
2.4 Antigen-Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode		12
3. MATERIAL UND METHODEN		16
1. Zweidimensionale Immundiffusion		16
2. Gelfiltration		16
3. Zonen-Elektrophorese		17
4. Affinitätschromatographie		18
4.1 Antikörperreinigung		18
4.2 Antigenreinigung		19
5. Isolierung von Antigenen		19
5.1 Immunglobulin G von Mensch, Kaninchen, Maus		19
5.2 Amyloidfibrillen-Protein A		22
5.3 Serum-Amyloid-A-Protein und dessen nieder-molekulare Komponente SAAL		22
6. Herstellen der Antiseren		22
6.1 Kaninchen-anti-Maus IgG		22
6.2 Schaf-anti-Kaninchen IgG		26
6.3 Kaninchen-anti-AA		26
6.4 Schaf-anti-AA		29
6.5 Schaf-anti-SAAL		29
7. Enzymkopplung		31
7.1 Peroxidase an Schaf-anti-Kaninchen IgG		32
7.2 Peroxidase an Maus IgG		33
7.3 Peroxidase an Kaninchen-anti-Maus IgG		33
7.4 Peroxidase an Schaf-anti-SAAL		34
7.5 Peroxidase an Kaninchen-anti-Human IgG		34
8. Indirekte Immunperoxidase-Technik		35

9. Peroxidase-Chromogen ABTS	35
10. Auswahl der festen Phase	37
11. ELISA zur Quantifizierung von Maus IgG	38
12. ELISA zur Quantifizierung von SAAL	40
13. ELISA zur Quantifizierung von AA	41
14. ELISA zur Quantifizierung von Auto-anti-AA	42
15. Patientenseren	43
16. Klinisch-chemische Daten	43
17. Hemmung von anti-AA Antikörpern durch gereinigtes Protein AA	44
4. RESULTATE	44
1. Auswahl der Mikrotiter-Platten	44
1.1 Vergleich unterschiedlicher Typen von Polystyrol-Mikrotiter-Platten	44
1.2 Vergleich unterschiedlicher Chargennummern der Polystyrol-Platte	45
1.3 Vergleich von Mikrotiter-Platten aus Polystyrol und PVC	49
2. Adsorption von Immunglobulinen an die feste Phase	49
2.1 Einfluß des pH-Wertes	49
2.2 Einfluß der Konzentration der Immunglobuline	55
3. Waschvorgang	55
4. Blocken	59
5. Abhängigkeit der spezifischen Bindung vom pH-Wert und der Salzkonzentration	59
6. Auswahl des Chromogens	61
7. Vergleich der Peroxidase-Immunglobulin-Konjugate	64
7.1 Peroxidase- und Immunglobulin-Verteilung	66
7.2 Molares Verhältnis von IgG zu Peroxidase	70
7.3 Ausbeute von IgG- und Peroxidase-Konjugat	70
7.4 Einsatz der Peroxidase-Kopplungen in der indirekten Immunperoxidase-Technik	73
7.5 Einsatz der Peroxidasekopplungen im ELISA	75
8. Preis einer Quantifizierung mit der Mikro-ELISA-Technik	78

9. Quantifizierung von Maus IgG	78
10. Quantifizierung von Protein AA (AA)	81
11. Quantifizierung der leichten Komponente des Serumamyloidfibrillen-Proteins A (SAAL)	81
11.1 Charakterisierung von SAAL	81
11.2 SAAL-Konzentrationen in normalen und in pathologischen Seren	84
12. Autoantikörper gegen Amyloidfibrillenprotein AA bei SLE	85
12.1 Einleitung	85
12.2 Anti-AA Aktivität in SLE-Seren	89
12.3 Identifizierung der AA-bindenden Moleküle	89
12.4 Korrelation von anti-AA Aktivität mit klinisch-chemischen Daten	93
5. DISKUSSION	97
1. Praktische Aspekte beim Erstellen eines ELISA-Testes	97
2. Auswahl der Platten	99
3. Auswahl des Chromogens	100
4. Spezifität des ELISA	100
5. Methoden zur Enzymkopplung	101
6. ELISA als Routinetest in der klinischen Labor-diagnostik	102
7. Bedeutung von Auto-AK in SLE gegen Protein AA	103
6. LITERATUR	105
7. DANKSAGUNG	118
8. LEBENS LAUF	119

ABKÜRZUNGEN

AA ^x	Amyloidfibrillen-Protein A
ABTS	2,2'-Azino-di (3-Äthyl-Benzthiazolin-Sulfon-säure)
Aλ ^x	Amyloid vom Immunglobulin-Ursprung der - leichten Kette
Aκ ^x	Amyloid vom Ursprung der κ -Kette
ASc ₁ ^x	Fibrillenprotein des kardialen Alters-Amy- loids, Ventrikel Typ
AF _p ^x	Amyloid der portugiesischen familiären Amy- loid-Polyneuropathie
AG	Antigen
AK	Antikörper
AS	5-Amino-Salizylsäure
EIA	Enzym-Inhibitions-Assay
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
DAB	Diaminobenzidin
GDA	Glutardialdehyd
HRP	Meerrettich-Peroxidase (HR von horseradish)
IgG, A, M	Immunglobulin G, A, M
kd	Kilodalton
MOS	Abkürzungen des Patientennamen, ebenso BUC, KEL usw.
OPD	ortho-Phenylendiamin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PBS Tween	PBS + 0,05% Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbi- tan-Monolaurat)
PVC	Polyvinylchlorid
RT	Raumtemperatur
SAA ^x	Serum-Amyloidprotein A

SAAL ^x	Niedermolekulare Komponente von SAA
SLE	systematischer Lupus erythematodes
Upm	Umdrehung pro Minute

^x In Übereinstimmung mit der Nomenklatur, empfohlen auf internationalen Konferenzen über Amyloidose (10,20)

1. EINLEITUNG

In der medizinischen Diagnostik haben immunologische Untersuchungsverfahren zunehmend an Bedeutung gewonnen, da mit Hilfe eines einzigen Testprinzips und damit der Möglichkeit zur Automatisierung unterschiedliche Substanzen qualitativ und quantitativ bestimmt werden können. Durch den Einsatz von Radionukliden wurden diese immunologischen Methoden soweit in ihrer Empfindlichkeit gesteigert, daß Substanzen wie Hormone, Serumproteine in geringer Konzentration wie oncofetale Proteine und verschiedene Auto- oder atopische Antikörper ebenso wie Medikamente quantifiziert werden können. Erst mit Hilfe dieser radioimmunologischen Verfahren war es möglich, z.B. endokrine Wirkmechanismen aufzuklären und ihre Störungen der Therapie zugänglich zu machen.

Mit der Ausweitung des Einsatzes der Radioimmunoassays und der Einführung neuer Radionuklide in Medizin und Forschung wurden die Nachteile zunehmend sichtbar und zum Teil untragbar. Zu nennen ist vor allem die Gesundheitsgefährdung, die umfangreiche Sicherheitsmaßnahmen erfordert. Kostenbelastend ist vor allem auch die aufwendige Apparatur zur Quantifizierung der Isotope. Nachteilig sind ferner die begrenzte Lebensdauer der Reagenzien und deren kostspielige Entsorgung.

Als vergleichbar empfindliche Alternative für ein Testsystem ohne Radioaktivität besteht die Möglichkeit, mit Hilfe von Enzymen Meßgrößen zu amplifizieren. Dabei werden Enzyme entweder an Antikörper oder an Antigene kovalent gekoppelt. Die Vorteile gegenüber Radionukliden sind die geringen Inve-

stitutionskosten der Meßgeräte, die praktisch unbegrenzte Lebensdauer der Reagenzien und deren gesundheitliche Unbedenklichkeit bei richtiger Handhabung. Aus diesen Gründen können Enzymimmunoassays, wie diese Testsysteme genannt werden, immer mehr die radioimmunologischen Verfahren ersetzen.

In dieser Arbeit soll das Serum-Amyloidprotein A (SAA) mit Hilfe eines Enzymimmunoassays quantitativ bestimmt werden. SAA ist ein Akutphasenprotein von 180.000 Dalton Größe (9, 43), das wahrscheinlich eine Konzentration im Nanogrammbe- reich pro Milliliter aufweist und während einer Akutphase seine Konzentration vom Hundert- bis zum Tausendfachen steigern kann, wie z.B. bei einer bakteriellen oder virusbeding- ten Infektion, post operationem sowie bei Gewebs- und Tumor- nekrosen (63). Die klinische Bedeutung dieses SAA-Proteins ist bisher nur ungenügend bekannt, nicht zuletzt weil ein standartisiertes Testsystem nicht etabliert ist. Bisher wurde SAA nur in unterschiedlichen Radioimmunoassays be- stimmt, wobei die Konzentration von SAA oder dessen nieder- molekulare Komponente SAAL nur in Relativeinheiten angegeben werden konnte. Die Ergebnisse der einzelnen Laboratorien schwanken daher erheblich. Dennoch hat man den SAA-Spiegel als eine wertvolle Meßgröße für die Krankheitsaktivität, etwa bei Rheumatoider Arthritis (44, 69) oder bei Tumorleiden (65), erkannt.

Die Notwendigkeit, SAA als Krankheitsaktivitäts-Marker ein- setzen zu können, und die erheblichen Vorteile des Enzymim- munoassays gegenüber anderen Methoden haben uns veranlaßt,

einen Enzymimmunoassay zu entwickeln, mit dessen Hilfe SAA/SAAL auf einfache Weise für den klinischen Routine-Einsatz etabliert werden kann. Da die Etablierung eines Enzymimmunoassays nur empirisch gelingt und daher einen größeren zeitlichen Aufwand erfordert, stand zunächst in dieser Arbeit das Erstellen dieses Immunoassays ganz im Vordergrund.

2. EINFÜHRUNG IN DEN ELISA-TEST

2.1. Geschichtliche Entwicklung

Nakane und Pierce (58) waren 1976 die ersten, die entsprechend der Idee der Antigendarstellung durch fluoresceinmarkierte Antikörper mit Enzymen gekoppelte Immunglobuline auf Gewebeschnitten einsetzten. Das Enzym war hierbei kovalent an den Antikörper gebunden, so daß durch einen Substrat-Chromogen-Zusatz die Antikörperbindung optisch dargestellt werden konnte. 1971 wurde von Engvall und Perlmann (26) ein Enzymimmunoassay zur Quantifizierung von löslichen Antigenen entwickelt. Für dessen Entwicklung war das Binden eines spezifischen Immunglobulins an eine feste Phase der entscheidende Schritt. Spezifische Antikörper, an Zellulose fixiert, binden Antigene, die kompetitiv von enzymmarkierten Antigenen der gleichen Spezifität verdrängt werden. Aus dem Maß der Verdrängung kann eine Standardkurve erstellt und mit deren Hilfe ein Antigen unbekannter Konzentration quantifiziert werden. Dieses Testprinzip wurde in der Folgezeit bestätigt und weiter ausgebaut (1, 25, 79). Da hierbei die Enzymkopplung das Hauptmerkmal ist, bezeichnet man die neue Meßmethode als "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA).

Als feste Phase kommen Plastikröhrchen beim Makro-ELISA und Plastik in Form von Mikrotiter-Platten beim Mikro-ELISA zur Anwendung. An die feste Phase werden spezifische Antikörper (bzw. Antigene) adsorbiert, die entsprechend ihrer Adsorption Antigene (bzw. Antikörper) binden können.

Die über die Immunreaktion gebundene Enzymaktivität bestimmt das Maß der Umwandlung von zugesetztem Substrat und Chromogen. Das zugesetzte Chromogen kann dann photometrisch bestimmt werden.

2.2 Testprinzipien

2.2.1. Enzym-Inhibitionsassay (EIA)

Bei dem Enzym-Inhibitionsassay (EIA), in Abb. 1 auf Seite 11 illustriert, wird ein spezifischer Antikörper an die feste Phase adsorbiert. Dabei läßt man zunächst ein bekanntes Antigen in definierter Konzentration binden und bestimmt im folgenden Arbeitsschritt mit Hilfe eines enzymmarkierten Antigen gleicher Spezifität die jetzt noch nicht besetzten Haftstellen des Antikörpers. Die Menge des gebundenen enzymmarkierten nicht verdrängten Antigens kann dann wie bei allen anderen Enzymimmunoassays nach Zusatz von Substrat und Chromogen photometrisch bestimmt werden. Markiertes und nicht markiertes Testantigen könnten auch gleichzeitig hinzugegeben werden. Die Verdrängung des markierten Antigens durch das unmarkierte ergibt eine Standardkurve, mit deren Hilfe ein unbekanntes Antigen quantifiziert werden kann.

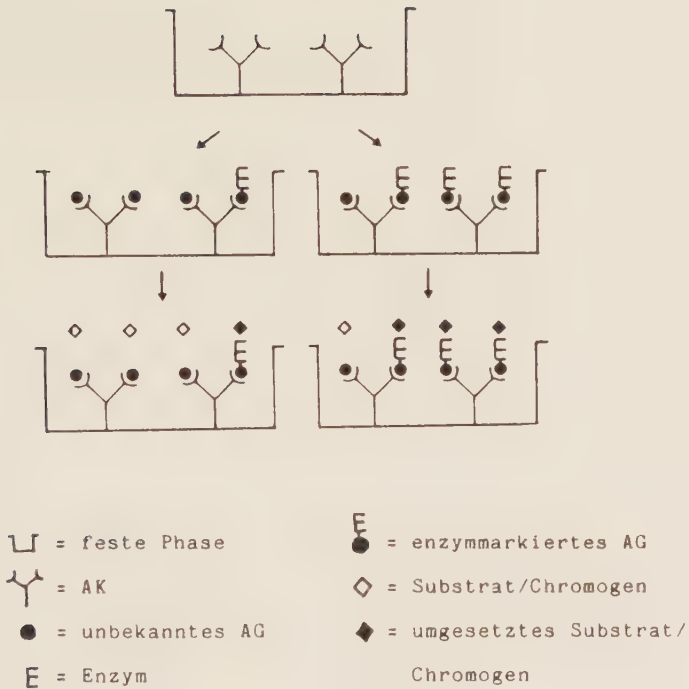


Abb. 1: Prinzip des Enzym-Inhibitionsassays (EIA)

1. Adsorption von spezifischem AK an die feste Phase
2. links: Bindung von unbekanntem AG mit hoher Konzentration, dadurch starke Verdrängung des enzymmarkierten AG
rechts: Bindung von unbekanntem AG mit niedriger Konzentration, dadurch geringe Verdrängung des enzymmarkierten AG
3. Zusatz von Substrat und Chromogen
links: Umsatz von wenig Substrat und Chromogen
rechts: Umsatz von viel Substrat und Chromogen

2.2.2. Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode

Bei der Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode (Abb. 2, Seite 13) wird an einen an die feste Phase adsorbierten spezifischen Antikörper Antigen gebunden, das über einen zweiten spezifischen enzymmarkierten Antikörper und anschließender enzymatischer Umsetzung von Substrat und Chromogen quantifiziert werden kann.

2.2.3. Antigen-Antikörper-Sandwich-Methode

Bei der Antigen-Antikörper-Sandwich-Methode (Abb. 3, Seite 14) bindet der zu quantifizierende Antikörper spezifisch an ein an die feste Phase fixiertes Antigen. Mit Hilfe eines enzymmarkierten Antikörpers kann dann der spezifisch gebundene Antikörper durch den Umsatz von Substrat und Chromogen quantifiziert werden.

2.2.4. Antigen-Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode

Bei der Antigen-Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode (Abb. 4, Seite 15) wird zunächst ein spezifischer Antikörper an die feste Phase adsorbiert, an den ein spezifisches Antigen gebunden wird. Das so insolubilisierete Antigen kann dann wie in der Antigen-Antikörper-Sandwich-Methode zur Quantifizierung von Antikörpern eingesetzt werden. Diese Variante kann gewählt werden, wenn ein Antigen schlecht an die feste Phase bindet. In gleicher Weise kann aber auch das gebundene Antigen quantifiziert werden.

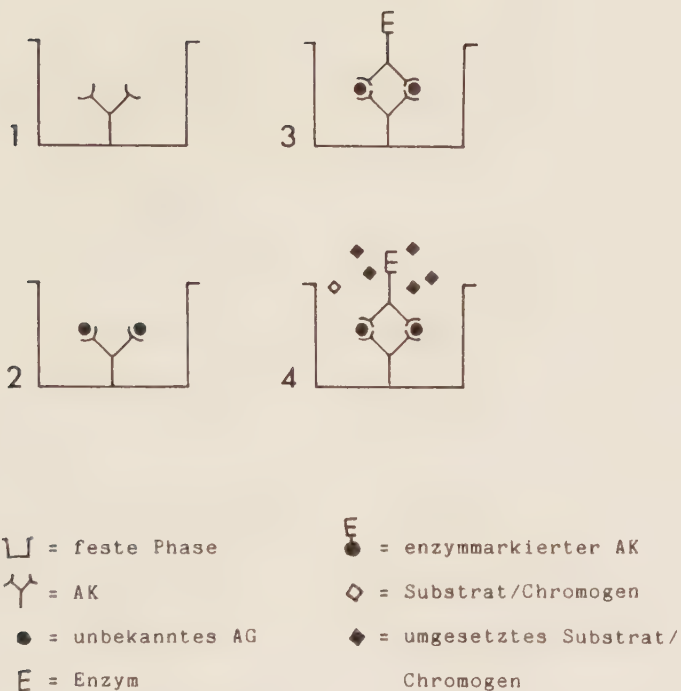


Abb. 2: Prinzip der Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode (ELISA)

1. Adsorption von spezifischem AK an die feste Phase
2. Bindung von unbekanntem AG
3. Bindung von spezifischem enzymmarkierten AK
4. Zusatz von Substrat und Chromogen

Umsetzung von Substrat und Chromogen proportional zur Menge gebundenen Enzyms

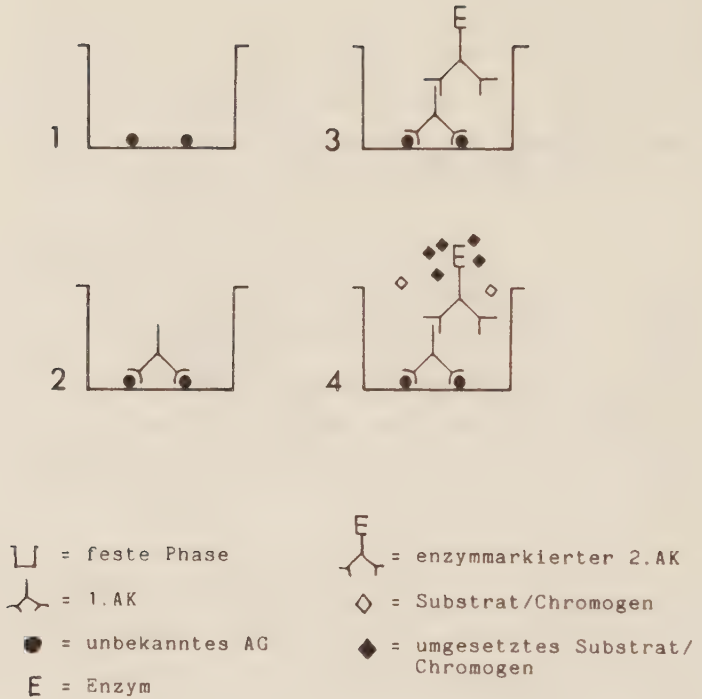


Abb. 3: Prinzip der Antigen-Antikörper-Sandwich-Methode

1. Adsorbition von spezifischem AG
2. Bindung des zu quantifizierenden AK
3. Bindung der enzymmarkierten AK, gerichtet gegen den zu quantifizierenden AK
4. Zusatz von Substrat und Chromogen

Umsatz von Substrat und Chromogen in Abhängigkeit der Menge gebundenen Enzyms

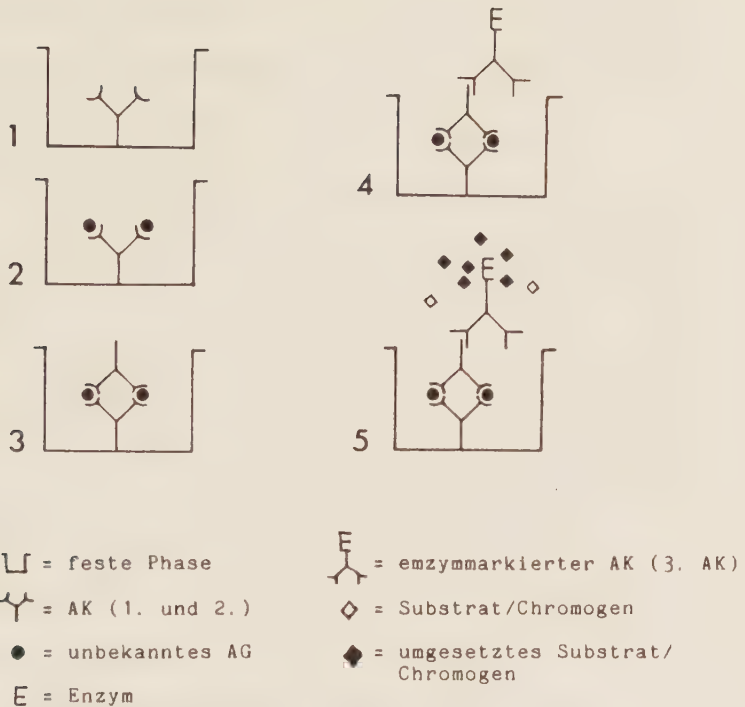


Abb. 4: Prinzip der Antigen-Doppel-Antikörper-Sandwich-Methode

1. Adsorption von spezifischem AK an die feste Phase
2. Bindung eines spezifischen AG
3. Bindung des unbekannten AK
4. Bindung des enzymmarkierten AK
5. Zusatz von Substrat und Chromogen und proportional abhängiger Umsatz des Substrates und des Chromogens von gebundenem Enzym

C. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zweidimensionale Immundiffusion, Ouchterlony-Test (62)

Eine 1,5% Agaroselösung (Seakem ME, Marine Colloids, Rockland, Maine, USA) wurde bei etwa 95°C in Veronalpuffer (0,1 N Barbitalpuffer, pH 8,6 mit 0,02% Natriumazid) unter Rühren hergestellt und 5 ml dieser Lösung in eine waagrecht gestellte Plastikpetrieschale (Ø 5 cm; Greiner, Nürtingen, F.R.G.) einpipettiert. Nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurden die Platten bei 4°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt. In die Agaroseplatten wurden Löcher von 1,5, 2 oder 3 mm Größe in 2-4 mm Abstand für die Antigen- und Antikörperlösungen gestanzt. Zur Optimierung der Präzipitationslinien wurden sowohl Antigen als auch Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Zum Teil wurde durch zeitlich unterschiedliches Füllen der Stanzlöcher, sowie mehrmaliges Nachfüllen ohne Unterbrechung die Präzipitation optimiert. Die Präzipitationslinien wurden nach eintägiger Reaktion bei RT beurteilt.

3.2. Fraktionierung von Seren durch Gelfiltration

Die Auftrennung von Seren nach dem Molekulargewicht erfolgte durch deszendierende Gelfiltration in Glassäulen. Als Gele standen Sephadex G-25 (1 x 25 cm, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden), Sephadex G-100 (2,5 x 95 cm, Pharmacia), Sephadex G-200 (2,5 x 95 cm, Pharmacia) und Sephacryl S-300 (2,0 x 84 cm, Pharmacia) zur Verfügung. Unter konstantem Druck von 15 cm H₂O wurden die Säulen mit PBS in 0,02% NaN₃ gepackt und eluiert. Die Tropfenzahl des Fließmittels

betrug 1-20/min. Entsprechend dem Elutionsprofil wurden die Fraktionen zusammengefaßt, gegen PBS dialysiert und durch Vakuumdialyse eingeengt oder gegen H₂O dialysiert und lyophilisiert. Zur Identifizierung der jeweils relevanten Proteine wurde die Immundiffusion eingesetzt.

3.3. Zonen-Elektrophorese (57)

Die Zonen-Elektrophorese diente zur präparativen Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer elektrischen Ladung. Als inerte Kunststoff-Trägermasse wurde Pevicon (Pevicon C 870, Serva, Heidelberg, FRG), ein Kopolymer aus Polyvinylchlorid und Polyvinylacetat, eingesetzt, mit 0,1 N Barbitalpuffer, pH 8,6 äquilibriert, zu einem Brei angerührt und in eine 48 x 18 x 1,5 cm große Wanne gegossen. Nach Entfernung überschüssigen Puffers und Aufbewahren bei 4°C wurden in 10 und 30 cm Entfernung von der Kathodenseite 2 bzw. 3 Rinnen von 0,5 cm Breite und 2-4 cm Länge mit dem Spatel für die Testlösungen ausgehoben.

Vor dem Auftragen wurden die Testlösungen gegen Na-Barbitalpuffer über Nacht dialysiert und mit Bromphenolblau zur Laufkontrolle versetzt. Bei einem Elektrophorese-Lauf wurden 5 Seren mit je 2-4 ml pro Rinne in einem elektrischen Feld von 200 Volt und 45 mA aufgetrennt. Nach 25 h Laufzeit bei 4°C wurde der Pevicon-Block in 2 cm breite Zonen vertikal zur Laufrichtung getrennt, diese Fraktionen wurden einzeln mit PBS eluiert. Für die einzelnen Fraktionen wurde die Proteinkonzentration nach Lowry (51) und entweder Antigenität oder Antikörperspezifität mit Hilfe der zweidimensiona-

len Immundiffusion (62) oder der Immunelektrophorese (67) bestimmt.

3.4. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wird eingesetzt, um sowohl Antigene als auch verschiedene Antikörper zu reinigen und anzureichern.

3.4.1. Antikörperreinigung

Gereinigte AG-Präparationen werden hierbei nach der Methode von Axen und Porath (4), in der Modifikation nach Cuatrecasas und Anfinsen (22), kovalent an Bromcyan-aktivierte Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) gebunden. Die noch reagierenden Gruppen waren mit 0,1 M Glycin-gepuffertem Lysin, pH 10,5 für 2 h bei RT inaktiviert. Die mit Antigen-gebundene Sepharose 4 B wurde in Glassäulen vor Gebrauch von nicht kovalent gebundenem Protein durch Überleiten von 20 ml 5 M Guanidin-HCl (Schwarz/Mann Cat. No. 820539) gereinigt. Vor dem Auftragen der Antiseren wurde das Komplementsystem inaktiviert (30 min, 56°C) und die Seren nachfolgend abzentrifugiert (15 min bei 10000 Upm). Die Antiseren wurden bei RT durch die Antigensäulen geleitet, wobei die Antikörper spezifisch an die Antigensäule banden. Alle nicht gebundenen Proteine wurden daraufhin mit PBS ausgewaschen.

In zwei Stufen, und zwar mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,4 und mit 3 M NH_4SCN in H_2O , konnten die gebundenen Immunglobuline eluiert werden. Die Proteinkonzentration wurde in den einzelnen Fraktionen bei 280 nm mit einem Fallbügelschreiber

(UCICORD LKB Bromma, Schweden) automatisch registriert. Anschließend folgte Dialysieren der Eluate gegen PBS und Einengen mit Hilfe der Negativdruck-Dialyse. Antikörperaktivität, Spezifität sowie die Immunglobulinnatur wurden mit Hilfe der Immundiffusion (Seite 16) und der Immunelektrophorese (67) für die einzelnen Fraktionen bestimmt.

3.4.2. Antigenreinigung

Zur Reinigung von Antigenen wurden affinitätsgereinigte Antikörper in 0,1 M Na-Citratpuffer, pH 6,5 in der gleichen Weise wie in Punkt 3.4.1. beschrieben, an Bromcyan-aktivierte Sepharose 4 B gekoppelt. Das Antikörper-Sepharose 4 B-Konjugat wurde nach Waschen mit 4 M Harnstoff, pH 4,5 und Äquilibrieren mit PBS mit der Antigenmischung beschickt. Die nicht gebundenen Antigene wurden mit PBS ausgewaschen. Die Elution der gebundenen Antigene erfolgte mit 4 M Harnstoff bei pH 4,5. Nach Dialysieren und Gefriertrocknen der Antigene schloß sich die Prüfung auf Reinheit an (siehe unten).

3.5. Isolierung von Antigenen

3.5.1. Immunglobulin G (IgG)

Immunglobulin G vom Mensch, vom Kaninchen und von der Maus wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie (siehe Seite 18) durch an Sepharose 6 B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) insolubilisierter AK präpariert. Die Reinheit der erhaltenen Proteine wurde mit Hilfe der Immundiffusion (Abb. 5, Seite 20) und der Immunelektrophorese (Abb. 6, Seite 21) überprüft. Immunglobulin der Maus wurde außerdem mit Hilfe der Zonen-Elektrophorese (Seite 17) und anschlies-

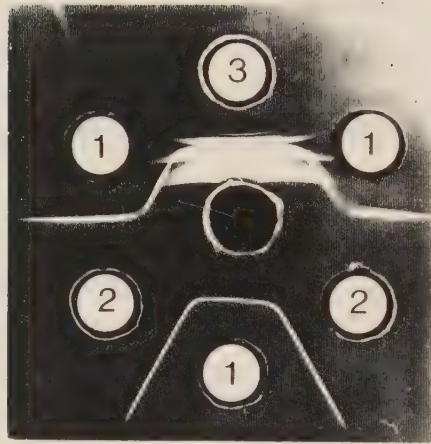


Abb. 5: Immundiffusion zur Demonstration der Reinheit eines Myelom-Proteins, das mit Hilfe der Zonen-Elektrophorese und der Gelfiltration gereinigt wurde

Mitte: Schaf-anti-Humanserum

- 1: Gereinigtes Myelom-Protein
- 2: Kaninchen-anti-gamma (IgG spezifisch) Immunglobulin
- 3: Normales Humanserum

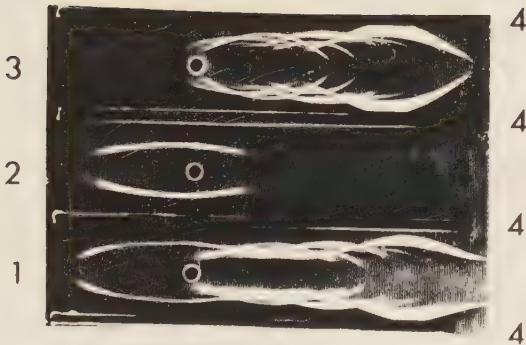


Abb. 6: Immunelektrophorese zur Illustration von polyklonalem Human-IgG, das mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt worden ist.

1. Humanserum
2. Eluierte Fraktion: gereinigtes IgG
3. Nichtgebundenes Protein (Serum ohne IgG)
4. Schaf-anti-Humanserum

Die Anode liegt rechts.

sender Gelfiltration (Seite 16) isoliert und ebenso auf Reinheit überprüft.

3.5.2. Amyloidfibrillen-Protein A (AA)

Das Amyloidfibrillen-Protein AA wurde von einem Patienten (MOS) mit rheumatoider Arthritis und generalisierter Amyloidose aus der Milz mit Hilfe der Differenzialzentrifugation und Gelfiltration in 5 M Guanidin-HCl isoliert (50). In der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (73) ergab sich ein Molekulargewicht von 8000-9000 Dalton. Die N-terminale Aminosäuresequenz, bestimmt nach der Methode von Chang et al. (18) modifizierten Mikro-Edmann-Methode, war Arg-Ser-Phe-Ser-Phe und damit identisch mit dem Protein AA-Prototyp von Benditt und Erikson (11).

3.5.3. Serum-Amyloidprotein A (SAA) und dessen niedermolekulare Komponente SAAL

SAAL wurde aus dem Aszites eines Patienten mit metastasierendem malignem Melanom, wie beschrieben (46), isoliert; seine N-terminale Aminosäuresequenz, bestimmt nach der oben genannten Methode, war Ser-Phe-Phe-Ser (46).

3.6 Herstellung der Antiseren

3.6.1. Herstellung von Kaninchen-anti-Maus IgG

AK gegen Maus IgG wurden im Kaninchen durch Immunisierung mit einer Emulsion von 0,5 mg Maus IgG, gelöst in 0,5 ml 0,9% NaCl-Lösung und 0,5 ml komplettem Freund'schen Adjuvanz (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), erzeugt. Die Emulsion wurde durch wiederholtes Aufziehen der zwei Phasen

in eine 2-ml-Injektionsspritze (Pharma-Plast GmbH, Braunschweig, FRG) über eine 2er Kanüle (Sterikan B, Braun Melsungen AG, Melsungen, FRG) hergestellt. Eine stabile Emulsion war dann erreicht, wenn ein Tropfen der Emulsion auf der Oberfläche von Leitungswasser zusammenhielt. Eine Antigenlösung von insgesamt 1 ml wurde subcutan möglichst distal in die vier Extremitäten injiziert. Die nachfolgenden Injektionen in die Inguinalgegend wurden mit einer Emulsion von 1 mg Maus IgG, gelöst in 0,5 ml 0,9% NaCl und 0,5 ml inkomplettem Freund'schen Adjuvanz (Difco) durchgeführt. Das Zeitschema der Immunisierung war: Nach der Erstinjektion folgten weitere Injektionen monatlich. Die Blutentnahmen wurden jeweils 5-7 Tage nach einer Injektion vorgenommen. Die Immunisierung dauerte etwa 1 Jahr. Aus dem Rohserum wurde ein spezifischer AK gegen IgG affinitätschromatographisch isoliert (Seite 18), der nicht mit Kaninchen und Schaf-IgG kreuzreagierte. Zur Isolierung von spezifisch gegen Maus IgG gerichtete AK wurden 20 ml eines Antiserums über vier hintereinander geschaltete Affinitätssäulen geleitet (Abb. 7, Seite 24). Folgende Antigene waren dabei an Bromzyan-aktivierte Sepharose 4 B kovalent gekoppelt:

I. Normales Kaninchen Serum; II. Normales Schaf Serum; III. IgG- und IgM-freies Maus Serum (Entfernung der Immunglobuline ebenfalls durch Affinitätschromatographie) und IV. Maus IgG. Die mit Hilfe von sauren und chaotropen Puffern erhaltenen Eluate (Abb. 8, Seite 25) wurden dialysiert (Visking-Dialyseschlauch Typ 8/32, Serva Feinchemica, Heidelberg, FRG), auf 5,0 mg/ml eingengt (Proteinbestimmung nach

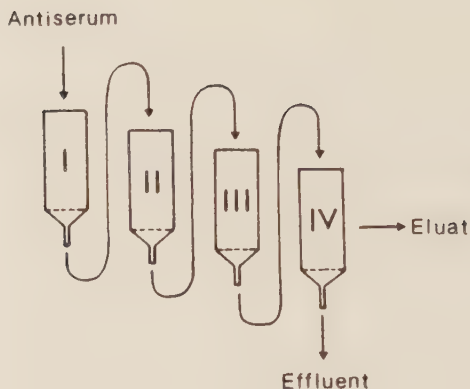


Abb. 7: Affinitätschromatographische Reinigung von Kaninchen-anti-Maus IgG

Geltyp der Säulen: Sepharose 4 B (2 x 30 cm)

Liganden der Säulen:

- I : Normales Kaninchen Serum
- II : Normales Schaf Serum
- III : IgG und IgM freies Maus Serum (Seite 23)
- IV : Maus IgG

Effluent: Antikörper ohne Kreuzreaktion mit IgG von Kaninchen, Schaf und Maus

Eluate von Säule IV: Anti Maus IgG ohne Kreuzreaktionen mit Kaninchen und Schaf IgG

Laufmittel: PBS, Tropfenzahl: 240/h
(Weitere Einzelheiten siehe Seite 23)

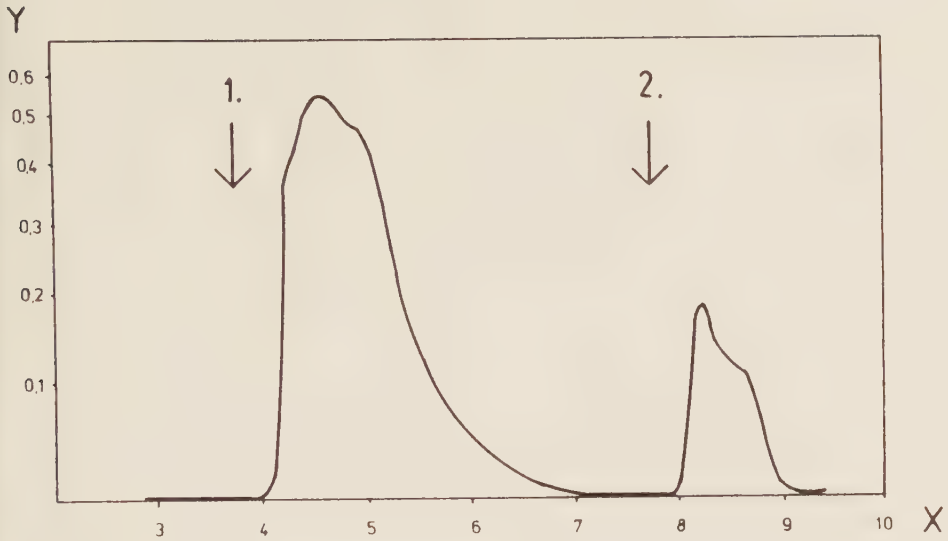


Abb. 8: Elution spezifischer Antikörper (Kaninchen-anti-Maus IgG) mit Hilfe der Affinitätschromatographie

Geltyp: Sepharose 4 B (2 x 30 cm); Ligand: Maus IgG
Laufmittel: PBS, Tropfenzahl: 1/sec
Tropfenzahl/Fraktion: 120

1. Elution mit 0.2 M Glycin/HCl, pH 2,6
2. Elution mit 3 M NH_4SCN
(Effluens ist nicht dargestellt)

Die Kurve ist eine Durchzeichnung der automatisch kontinuierlich aufgezeichneten optischen Dichte bei 280 nm (Uvicord II Monitor, LKB Instruments, Gräfelfing, FRG), wie auch die Abbildungen 9 und 10.

X: Fraktionen (Anzahl)
Y: Optische Dichte (O.D.) bei 280 nm

Lowry, 51) und in 50 μ l Portionen bei -80°C gelagert.

3.6.2. Schaf-anti-Kaninchen IgG

Nach Immunisierung eines 1 1/2 jährigen Merino-Schafes mit gereinigtem Kaninchen IgG (Seite 19) wurden die induzierten AK affinitätschromatographisch an Kaninchen-IgG-Sepharose gereinigt. Ein typisches Elutionsprofil ist in Abb. 9, Seite 27 dargestellt. Die Elutionen wurden separat gegen PBS dialysiert und die Aktivität der AK in der zweidimensionalen Immundiffusion (Seite 16) untersucht. Die Eluate präzipitierten mit Kaninchen IgG, möglicherweise auch schwach mit Kaninchen IgA und IgM, nicht jedoch mit anderen Kaninchen Serumproteinen.

3.6.3. Kaninchen-anti-AA

Fünf Kaninchen wurden mit einer Emulsion von 0,5-1,0 mg Amyloidfibrillen-Protein AA und Freund'schem Adjuvanz immunisiert (s.o.). Reine AK wurden affinitätschromatographisch isoliert (s.o.). 10 ml Antiserum hatten drei hintereinandergeschaltete Säulen zu passieren. Die erste Säule enthielt insolubilisiertes Humanserum, die zweite humanes Milzpulver, die dritte Protein AA. Von der Protein AA-Säule wurden die gebundenen Immunglobuline durch saure und chaotrope Puffer eluiert, wie auf Seite 23 dargestellt. Effluens und Eluate wurden auf 5 mg Protein/ml (Bestimmung nach Lowry, 51) eingengt und gegen PBS dialysiert. Die Reinheit der erhaltenen AK gegen AA und deren vollständige Entfernung aus dem Serum wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Immundiffusion (s.o.) und der Immunelektrophorese (s.o.) vorgenommen. Eine

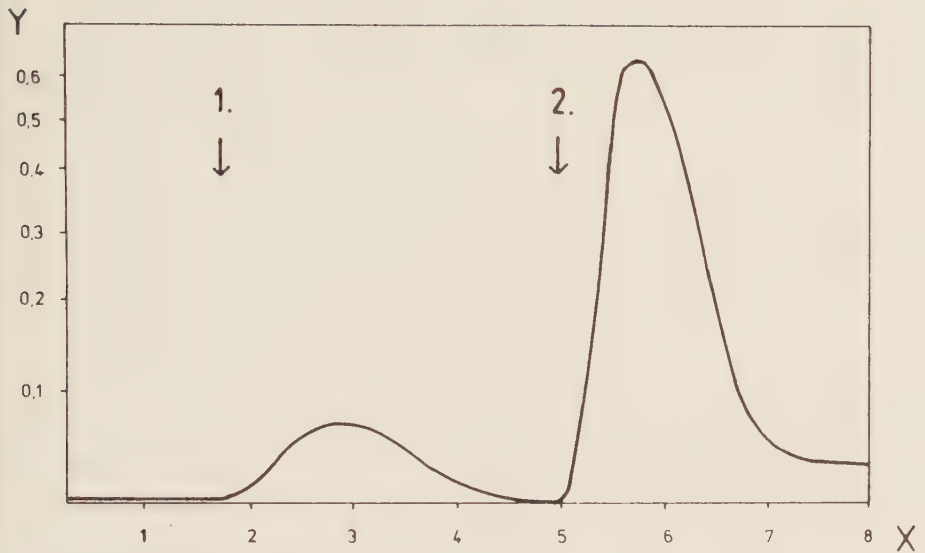


Abb. 9: Elution spezifischer Antikörper (Schaf-anti-Kaninchen IgG) mit Hilfe der Affinitätschromatographie

Geltyp: Sepharose 4 B (2 x 30 cm), Ligand: Kaninchen-IgG, Laufmittel: PBS, Tropfenzahl: 1/sec

1. Elution mit 0.2 M Glycin/HCl, pH 2,6
2. Elution mit 3 M NH_4SCN
(Effluens ist nicht dargestellt)

X: Fraktionen (Anzahl)
Y: O.D. bei 280 nm

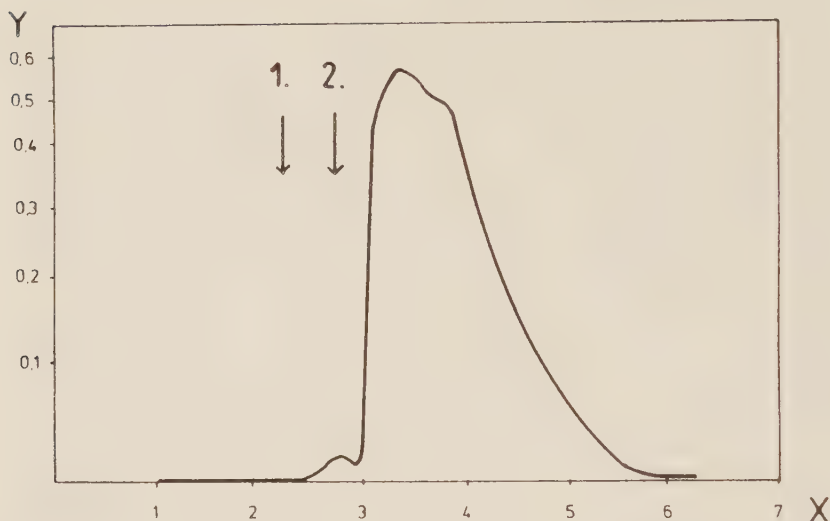


Abb. 10: Affinitätschromatographische Reinigung von Kanimchen-anti-AA aus 10 ml Antiserum

Das Antiserum passierte 3 als Tandem hintereinandergeschaltete Säulen mit normalem Human Serum, humanem Milzpulver und Protein AA als Liganden.

Die Fraktionen 3-6 (von der AA-Säule eluierte Antikörper) wurden zusammengefaßt und auf 8 mg Protein/ml eingeeengt.

(Das Effluens ist nicht dargestellt).

1. Elution mit 0.2 M Glycin/HCl, pH 2,6
2. Elution mit 3 M NH_4 SCN

X: Fraktionen

Y: O.D. bei 280 nm

isolierte AK-Präparation kann nur dann als spezifisch gelten, wenn Protein AA, nicht aber andere Amyloidfibrillen-Proteine, wie z.B. A λ , A α , ASc₁, AF_p, und Serumproteine präzipitiert wurden.

3.6.4. Schaf-anti-AA

Wie berichtet (48) wurde ein Antiserum gegen AA in einem Merino-Schaf präpariert. Die AK wurden affinitätschromatographisch gereinigt. Dazu wurden 20 ml Antiserum über zwei hintereinander geschaltete Säulen geleitet. Die erste Säule enthielt insolubilisiertes normales Human-Serum, die zweite Protein AA. Die von der Protein AA-Säule eluierten AK wurden nach Dialyse gegen PBS auf 4,0 mg/ml eingeeengt und deren Spezifität in der Immundiffusion (Ouchterlony-Test) untersucht. Die Spezifität des eluierten AK wurde nachgewiesen durch Präzipitation nur mit Protein AA, jedoch weder mit Proteinen im Normalserum noch mit anderen Amyloidfibrillen-Proteinen.

3.6.5. Schaf-anti-SAAL

Mit gereinigtem SAAL (46) wurde ein Merino-Schaf immunisiert (48) und aus 50 ml dieses Antiserums spezifische AK gegen SAAL affinitätschromatographisch gereinigt. Das Serum wurde hierzu über eine Säule mit normalem Humanserum und dann über eine mit SAAL geleitet. Ein typisches Elutionsprofil ist in Abb. 11 auf Seite 30 dargestellt. Nach Dialyse gegen PBS und Einengung wurden diese in der zweidimensionalen Immundiffusion auf ihre Antikörperaktivität überprüft. Ein spezifischer AK gegen SAAL wurde nachgewiesen durch eine Präzipi-

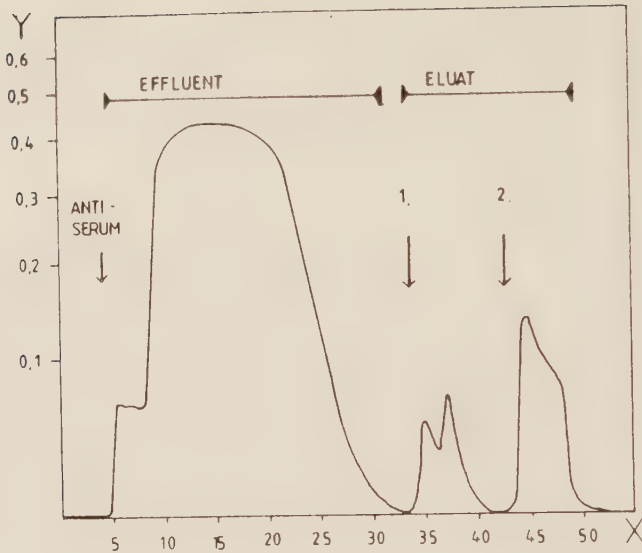


Abb. 11: Affinitätschromatographische Reinigung von Schaf-anti-SAAL

Geltyp: Sepharose 4 B, Laufmittel: PBS
Tropfenzahl: 1/sec, Tropfenzahl/Fraktion: 120
Ligand der ersten Säule: Normales Human Serum
Ligand der zweiten Säule: SAAL

Nach Durchlauf des Effluens, Elution der zweiten Säule:
1. Elution mit 0.2 M Glycin/HCl, pH 2,6
2. Elution mit 3 M NH_4SCN

X: Fraktionen
Y: O.D. bei 280 nm

tationslinie gegen AA und SAAL (mit einem Sporn von SAAL über AA) bei fehlender Präzipitation gegen andere Serumproteine.

3.7. Enzymkopplung

Zur Enzymkopplung fanden affinitätschromatographisch gereinigte AK bzw. gereinigte AG Verwendung. Als Enzym wurde aus Meerrettich gewonnene Peroxidase (HRP, RZ 3,0, Boehringer Mannheim GmbH, FRG) gewählt. HRP ist im Verhältnis zu anderen Enzymen relativ stabil, preisgünstig und kann verhältnismäßig leicht gekoppelt werden. Außerdem besitzt es eine Reihe von einfach durchführbaren Indikatorsystemen. Bei der kovalenten Kopplung beider Proteine muß die biologische Funktion eines jeden Reaktanten erhalten bleiben, d.h., in diesem Falle die Antikörperspezifität und die enzymatische Funktion. Zur kovalenten Kopplung können u.a. Aldehydgruppen eingesetzt werden, wie z.B. bei der Glutardialdehyd-Methode von Avrameas und Ternyck (2) und der Na-Perjodat-Methode von Wilson und Nakane (59,85). Beide Methoden wurden in der Arbeit eingesetzt.

a) Die Glutardialdehyd-Methode (2):

Die beiden Aldehydgruppen des GDA können mit freien Amino-
gruppen von Proteinen unter H_2O -Abspaltung eine Schiff'sche Base bilden, wobei z.B. Enzyme mit AG bzw. AK eine kovalente Bindung eingehen. HRP mit einem nur geringen Gehalt an freien Aminogruppen kann mit GDA in einer Zwei-Schritt-Methode in genügend hohem Maß mit Proteinen kreuzvernetzt werden (66,79). Bei diesem Verfahren bindet zunächst GDA mit

Überschuß an HRP, wobei GDA vorwiegend univalent bindet. An die zweite Aldehydgruppe kann dann Protein gekoppelt werden.

b) Die Perjodat-Methode (59,85)

Durch Na-Perjodat können die Hydroxylgruppen der HRP zu Aldehydgruppen oxidiert werden. Die Aldehydgruppen reagieren dann wie bei der GDA-Methode mit den Aminogruppen der Proteine (39,66).

3.7.1. Kopplung von Peroxidase und Schaf-anti-Kaninchen IgG

Die Enzymkopplung wurde mit der GDA-Methode (siehe oben) nach Avrameas und Ternyck (2) in modifizierter Form durchgeführt. 225 mg Peroxidase (HRP, RZ = 3,0, Boehringer Mannheim) wurden in 9,0 ml 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 6,8 gelöst, mit 1,25% GDA versetzt und bei 4°C über Nacht leicht gerührt. Das ungebundene GDA wurde durch Gelfiltration (Sephadex G 25, in PBS, pH 7,2) entfernt. Die braunen Fraktionen, die die "aktivierte" Peroxidase enthielten, wurden nach Kühlung auf 4°C mit 75 mg Schaf-anti-Kaninchen, gelöst in 15 ml PBS, pH 7,3, unter Rühren gemischt. Die Lösung wurde durch Zusatz von 6 ml 0,1 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,5 auf pH 7,6 gebracht. Nach 2 h bei RT wurden 1,5 ml einer 0,2 M Lysin-Lösung tropfenweise unter Rühren zugegeben. In halb-gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung wurden die Immunglobuline für 2 h bei 4°C präzipitiert, bei 10.000 Upm für 10 min vom Überstand getrennt und in wenig PBS gelöst. Die Proteinfällung wurde in gleicher Weise noch zweimal wiederholt. Die Immunglobuline wurden dann über eine Sephacryl S 300 getrennt (s.o.).

3.7.2. Kopplung von Peroxidase und Maus IgG

Peroxidase wurde an Maus IgG in der oben geschilderten variierten Form der GDA-Methode nach Avrameas und Ternyck (2) gekoppelt.

Die Kopplung wurde mit 55 mg HRP (RZ = 3,0; Serva, Heidelberg, F.R.G.) und 18,5 mg Maus IgG (Miles, Frankfurt, F.R.G.) durchgeführt.

3.7.3. Kopplung von Peroxidase und Kaninchen-anti-Maus IgG

An affinitätschromatographisch gereinigtes Kaninchen-anti-Maus IgG (s.o.) wurde HRP nach der Na-Perjodat-Methode nach Wilson und Nakane (59,85) gekoppelt. 25 mg HRP (RZ = 3,0; Boehringer, Mannheim, F.R.G.) wurden in 5 ml 0,3 M NaHCO_3 , pH 8,1 gelöst. 0,5 ml einer 1% FDNB-Lösung (2,4 Dinitrofluorobenzol; Serva, Heidelberg, F.R.G.) in Äthanol abs. wurden zugesetzt und die Lösung für 1 h bei RT bewegt. Danach wurden 5 ml einer 0,06 M NaIO_4 -Lösung in Aqua dest. zugesetzt und 1/2 h behutsam gerührt, wobei die Farbe von grün nach gelb umschlug. Nach Zugabe von 5 ml 0,16 M Äthylenglycol (Serva, Heidelberg, F.R.G.) für 1 h bei RT wurde die Lösung anschließend bei 4°C gegen 5 x 600 ml 0,01 M Na_2CO_3 -Puffer, pH 9,5 dialysiert und war dann bereit zur Kopplung an Immunglobuline ("aktive Peroxidase").

25 mg Kaninchen-anti-Maus IgG, in 4,8 ml PBS, pH 7,2 gelöst, wurden auf einen pH-Wert von 9,6 mit $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ -Puffer, pH 10,9 gebracht. Das Volumen der Lösung stieg hierbei auf 17 ml an. In die Lösung (15 ml), mit HRP aktiviert, wurde nun tropfenweise das gelöste anti-Maus IgG (17 ml) bei 4°C

hinzugegeben und bei RT 2 1/2 h leicht gerührt. Danach wurden 30 mg NaHB₄ (Quotient aus NaHB₄ und HRP gleich 1,2) unter leichtem Rühren zugesetzt und die Lösung nach 4,5 h bei 4°C gegen PBS (mehrmaliges Wechseln von PBS) für 24 h dialysiert. In einem anderen Zusatz wurden mit der gleichen Methode 50 mg Schaf-anti-Kaninchen IgG mit 150 mg HRP zur Kopplung eingesetzt. Danach erfolgte Zugabe von einer Glycin gepufferten 1 M Lysin-Lösung, pH 10,4.

3.7.4. Kopplung von Peroxidase und Schaf-anti-SAAL

Hierzu wurde die modifizierte Art der Na-Perjodat-Methode nach Wilson und Nakane (59,85) eingesetzt. 8 mg HRP (RZ = 3,0; Boehringer Mannheim, F.R.G.) wurden in 2 ml Aqua dest. gelöst und 0,4 ml frisch hergestelltes 0,1 M NaJO₄ (Sigma Chemical Company, München, FRG) zugesetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 20 min unter leichtem Rühren wurde die Lösung gegen Na-acetat-Puffer, pH 4,4 bei 4°C über Nacht dialysiert.

Eine Lösung von 16 mg Schaf-anti-SAAL in PBS, pH 7,2 wurde mit 0,2 M Carbonatpuffer, pH 9,6 auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt und die aktivierte Peroxidaselösung zunächst unter Rühren schnell hinzugegeben. Nach 2 h bei leichtem Rühren wurden 0,2 ml eines frisch hergestellten NaHB₄ (4 mg/ml Aqua dest., Serva, Heidelberg, F.R.G.) zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei RT folgte eine Proteinfällung in 50% (NH₄)₂SO₄ (s.o.) und Dialyse gegen PBS.

3.7.5. Kopplung von Peroxidase und Kaninchen-anti-Human IgG

Kaninchen-anti-Human IgG wurde mit HRP nach der modifi-

zierten Methode (s.o.) gekoppelt. 10 mg HRP (RZ = 3,0, Boehringer, Mannheim, F.R.G.) und affinitätsgereinigtes Kaninchen-anti-Human IgG in 0,55 ml PBS wurden hierzu eingesetzt.

3.8. Indirekte Immunperoxidase-Technik

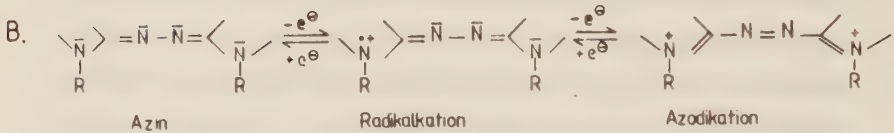
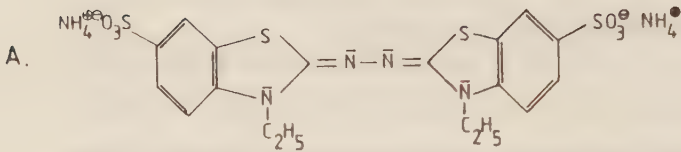
Um die Enzymaktivität und Antikörperbindungsfähigkeit zu überprüfen, wurde das Peroxidase-markierte Schaf-anti-Kaninchen IgG in der indirekten Immunperoxidase-Technik eingesetzt.

IgG-produzierende Hybridomzellklone der Maus wurden auf Objektträger ausgestrichen und nach Lufttrocknen für 10 min in Aceton fixiert. Die mögliche endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 3% H_2O_2 in Wasser für 5 min geblockt und die fixierten Zellen dreimal mit PBS jeweils 5 min gewaschen. Nach Überschichtung mit einem eigenen Kaninchen-anti-Maus IgG Antiserum für 2 h und Waschen (wie oben) erfolgte Inkubation mit Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen IgG (1/50 in PBS verdünnt) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (siehe oben) wurde die Substrat-Chromogenlösung (50 μ g 3,3 Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (Fluka GmbH, Neu-Ulm, FRG) in 100 ml PBS + 100 μ l 30% H_2O_2) für 8 min appliziert und danach in PBS abgewaschen. Die Gegenfärbung wurde mit Haemalaun nach Mayer für 8 sek durchgeführt und in Leitungswasser gebläut. Die Eindeckung erfolgte mit Kaisers Glyringelatine (E. Merck, Darmstadt, F.R.G.).

3.9. Peroxidase-Chromogen ABTS

Das Ammoniumsalz der 2,2'-Azino-di (3-Äthyl-Benzthiazolin-

Sulfonsäure), abgekürzt ABTS, besitzt folgende Strukturformel (A):



Das Molekül bildet durch zwei Elektronenübergänge ein reversibles Redoxsystem mit zwei höheren Oxidationsstufen (B).

Das Ammoniumsalz der reduzierten Stufe von ABTS ist farblos und gut wasserlöslich. Bei der durch Peroxidase katalysierten Oxidation mit Wasserstoffperoxid entsteht im neutralen Milieu das intensiv grünblau gefärbte Radikalkation. Oxidation zur höheren Stufe des Azodiquartärsalzes ist im sauren Medium mit starken Oxidantien, wie dem NaJO_4 , möglich. Es entsteht dabei eine noch stabilere Verbindung des Farbstoffes. Im Absorptionsspektrum zeigt die reduzierte Form von ABTS bei 343 nm die längstwellige und die oxidierten Formen bei 420 nm eine weitere Absorptionsbande mit einer Schulter bei 405 nm auf, eine weniger intensive Bande liegt bei 650 nm.

Die photometrische Untersuchung der Peroxidase-katalysierten Oxidationsreaktion von ABTS zeigt, daß bei hohen Konzentrationen Peroxidase das Azin sehr rasch in die oxidierte Stufe des Radikalkations übergeht, dann aber in einer Sekundärreaktion die Stufe des Azins wieder einnimmt. Die Absorptionsbande der oxidierten Form wird dabei wieder abgebaut. Wird die Oxidation jedoch bei niedrigen Konzentrationen an Peroxidase durchgeführt, wird die Sekundärreaktion unterdrückt und die Extinktion im Absorptionsmaximum für die oxidierte Form steigt mit Dauer der Enzym-Substrat-Reaktionszeit an. Niedrige Konzentrationen von Peroxidase lassen sich so durch lange Inkubationen von ABTS mit dem Enzym nachweisen.

3.10. Auswahl der festen Phase

Unter den möglichen Materialien, die Proteine in definierter Menge binden können, kommen Plastik (15), Polykarbonate

(78), mikrokristallines Glas (34,36), Cellulose (79), Isothiocyanat-Derivate (33) und Polyacrylamide (79) zur Anwendung. In dieser Arbeit wurden Polyvinylchlorid und Polystyrol als feste Phase verwendet, da beide Materialien Proteine reproduzierbar absorbieren können. Die Adsorption erreicht ihr annäherndes Maximum nach 1 bis 2 h bei RT (82). Die Adsorption der Immunglobuline an die feste Phase wurde allerdings bei den hier durchgeführten Versuchen bis zur völligen Sättigung bei Nacht bei 4°C durchgeführt. Dies resultierte auch in besser reproduzierbaren Werten gegenüber kürzeren Adsorptionszeiten bei höheren Temperaturen (19). Für den Mikro-ELISA wurden Mikrotiter-Platten gewählt, da diese zeitsparendes, manuelles Handhaben ermöglichen und sie leicht in automatisierte Arbeitsschritte, wie z.B. beim Messen der Absorption, eingesetzt werden können.

3.11. ELISA zur Quantifizierung von Maus IgG

a) Material und Reagenzien:

1. PBS, pH 7,2
2. PBS + 0,05% Tween 20 (Polyoxyäthylen-Sorbitan-Monolaurat, Fluka AG, Neu-Ulm, FRG)
3. Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,08
4. ABTS (Sigma Chemia GmbH, München, FRG)
5. Na-Perborat (Fluka GmbH, Neu-Ulm, F.R.G.)
6. Chromogen-Substrat-Lösung
4 mmol ABTS + 1,47 mmol Na-perborat gelöst in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,08
7. Mikro-ELISA-Reader (Titertek Multitek, Flow Laboratories, Meckenheim, F.R.G.)
8. Polystyrol-Mikrotiter-Platten mit 96 Löchern (Nr. 431250, Dynatech GmbH, Plochingen, F.R.G.)

9. Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,6
 10. Kaninchen-anti-Maus IgG (siehe Seite 22)
 11. Maus IgG (siehe Seite 19)
 12. Peroxidase-markiertes Kaninchen-anti-Maus IgG (siehe Seite 33)
 13. Blockmittel: 20% normales Kaninchen Serum in PBS, pH 7,2
- b) Durchführung

Die Doppel-AK-Sandwich-Methode (ELISA) wurde zur Quantifizierung von Maus IgG eingesetzt (Seite 12). Pro Loch einer Polystyrol-Mikrotiter-Platte wurden 100 μ l 1 μ g/ml Kaninchen-anti-Maus IgG, gelöst in PBS, pH 7,2 einpipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei RT wurden die Platten zunächst dreimal mit Leitungswasser gewaschen und anschließend mit 20% normalem Kaninchen Serum in PBS, pH 7,2 geblockt. Nach Waschen (wie oben) wurden pro Loch 100 μ l der Testproben einer Verdünnungsreihe von Maus IgG in einer Konzentration von 40–2500 ng/ml zur Erstellung einer Standardkurve aufgetragen. Die Verdünnung der Testseren und die unterschiedlich konzentrierten Lösungen von Maus IgG wurden in Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,6 hergestellt und 2 h inkubiert. Einem abermaligen Waschen wie oben folgte die Inkubation von 1/1000 Peroxidase-markiertem Kaninchen-anti-Maus IgG, gelöst in PBS Tween. Nach einer Inkubationszeit von 1 h und fünfmaligem Waschen der Platten für 10 min wurden je 95 μ l der Chromogen-Substrat-Lösung in die Löcher pipettiert und nach 1/2 h die Adsorption der einzelnen Proben im Mikro-ELISA-Reader bei 420 nm ermittelt. Die Standardkurve ergab sich aus den Absorptionswerten, die mit Maus

IgG von bekannten Konzentrationen erhalten wurde. In dieser Standardkurve konnten Konzentrationen unbekannter Proteine ermittelt werden. Alle Meßwerte sind Durchschnittswerte von Dreifachbestimmungen.

3.12. ELISA zur Quantifizierung von SAAL

a) Material und Reagenzien

1.-7. wie Seite 38

8. Polyvinylchlorid-Mikrotiter-Platten (Dynatech GmbH, Plochingen, F.R.G.)

9. Schaf-anti-SAAL (siehe Seite 29)

10. SAAL (Seite 22)

11. Peroxidase-markiertes Schaf-anti-SAAL (Seite 34)

12. Blockmittel: normales Schaf Serum

b) Durchführung:

Um SAAL zu quantifizieren wurde die Doppel-AK-Sandwich-Methode (ELISA) angewandt (Seite 12). In die 96 Löcher der PVC-Mikrotiter-Platten wurden je 100 μ l Lösung pro Testschritt mit einer 8-Kanül-Pipette eingefüllt. Zunächst wurde affinitätschromatographisch gereinigtes Schaf-anti-SAAL, 10 μ l/ml gelöst in PBS, pH 7,2 bei 4°C über Nacht an die Platte adsorbiert. Dreimaliges Waschen für 5 min bei RT folgte in Leitungswasser. Nach Blocken mit 10% normalem Schaf Serum in PBS Tween für 1 h bei RT wurden die Platten wie oben gewaschen. Anschließend erfolgte die zweistündige Inkubation einer Verdünnungsreihe von SAAL von 4-2000 ng/ml und der Testseren in verschiedenen Verdünnungen mit PBS Tween und 2,7% NaCl. Nach erneutem Waschen (wie oben) wurde die Platte mit Peroxidase-markiertem Schaf-anti-SAAL 1/600 bzw. 1/900

in PBS Tween verdünnt, für 1 h inkubiert und danach fünf mal mit Leitungswasser für 10 min gewaschen. Die Substrat-Chromogen-Lösung wurde dann zugesetzt und die Absorption der einzelnen Proben nach 1 1/2 h bei 420 nm im Mikro-ELISA-Reader gemessen.

3.13. ELISA zur Quantifizierung von AA

a) Material und Reagenzien

1.-8. wie Seite 38

9. Schaf-anti-AA (siehe Seite 29)

10. AA (Seite 22)

11. Kaninchen-anti-AA (Seite 26)

12. Peroxidase-markiertes Schaf-anti-Kaninchen IgG (Seite 32)

13. Blockmittel: PBS Tween und 2,7% NaCl, pH 7,2

14. Barbitalpuffer, pH 8,6

15. Waschlösung: PBS + 2,7% NaCl, PBS Tween und 2,7% NaCl

b) Durchführung

Protein AA wurde mit der Doppel-AK-Sandwich-Methode (Seite 12) quantifiziert. Als feste Phase dienten Polystyrol-Mikrotiter-Platten, in deren 96 Löcher jeweils 100 µl der Testlösungen mit einer 8-Kanül-Pipette eingefüllt wurden. Nach Adsorption von 0,5 µg/ml Schaf-anti-AA in Barbitalpuffer (pH 8,6 bei 4°C über Nacht) wurde bei RT weiterverfahren. Zweimal wurde zunächst mit PBS und 2,7% NaCl, pH 7,2 für 5 min gewaschen und anschließend die Platte mit dem Waschpuffer 1/2 h geblockt. Es folgte die Inkubation von AA (1-4200 ng/ml) und der Testseren jeweils in einer Verdünnungsreihe in PBS Tween und 2,7% NaCl für 2 h. Nach dreimaligem Waschen

mit PBS Tween und 2,7% NaCl für 5 min wurden die Platten mit 1/50 in PBS Tween und 2,7% NaCl verdünntem Kaninchen-anti-AA Serum inkubiert. Wie zuvor folgte Waschen und anschließend die Inkubation von 1/400 Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen IgG, verdünnt in PBS Tween und 2,7% NaCl. 1 h Inkubationszeit folgte, danach wurde nach fünf maligem Waschen wie oben die Substrat-Chromogen-Lösung zugesetzt. Nach 45 min erfolgte die photometrische Messung bei 420 nm.

3.14. ELISA zur Quantifizierung von Autoantikörper gegen AA

a) Material und Reagenzien:

1.-10. siehe Seite 38, 39

11. Testseren (von Patienten mit SLE)

12. Peroxidase-markiertes Ziege-anti-Human IgG (Miles-Yeda Ltd., Israel)

13. Blockmittel: 0,5% Casein (E. Merck, Darmstadt, F.R.G.) gelöst in PBS Tween

b) Durchführung

Eine AG-Doppel-AK-Sandwich-Methode (Seite 12) wurde benutzt, um Autoantikörper gegen AA zu identifizieren. An Polystyrol-Mikrotiter-Platten wurden affinitätschromatographisch gereinigte Schafantikörper, die gegen Protein AA gerichtet waren, adsorbiert. 100 µl der in PBS gelösten AK-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg Protein/ml wurden in jedes der 96 Löcher der Mikrotiter-Platten pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert. Das weitere Verfahren erfolgte bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Leitungswasser für 5 min wurden die einzelnen Löcher mit 100 µl einer Lösung von 3 µg/ml Protein AA (MOS) in Barbitalpuffer, pH 8,6 gefüllt.

Nach 2 h wurden die Platten wie oben gewaschen und mit 0,5% Casein gelöst in PBS Tween, für 1/2 h geblockt. Nach Dekantieren des Blockmittels wurden die Testseren in unterschiedlichen Verdünnungen in PBS Tween für 1 h eingefüllt. Nach Waschen (siehe oben) wurde 1/1000 einer Präparation von Peroxidase-gekoppeltem Schaf-anti-Human IgG, verdünnt in PBS Tween, für 45 min aufgetragen. Nach fünfmaligem Waschen mit Leitungswasser für 10 min erfolgte die 45 minütige Inkubation von 95 μ l/Loch der Chromogen-Substrat-Lösung. Anschließend wurde die Absorption für jedes Loch mit einem Mikro-ELISA-Reader bei 420 nm gemessen. Jede Bestimmung erfolgte dreifach.

3.15. Patientenseren

Die Untersuchungsseren wurden von gesunden Blutspendern und von Patienten gewonnen, die an Rheumatoider Arthritis (RhA), M. Still, M. Reiter, Arthritis Urica, rezidivierenden Kniegelenksergüssen, Oligo- oder Polyarthritits, Masern, Multipler Furunkulose, Ovarial-Carcinom oder Systemischem Lupus Erythematodes (SLE) erkrankt waren. Die an SLE erkrankten Patienten erfüllten die Kriterien der American Rheumatism Association für die Diagnose von SLE (19).

Die untersuchten Seren wurden bei -20°C bis zu drei Jahre aufbewahrt. Eingefrorene und frisch erhaltene Seren zeigten hinsichtlich ihrer Antikörperreaktivität keine Unterschiede.

3.16. Klinisch-chemische Daten

Die klinisch-chemischen Daten wurden mit Hilfe veröffentlichter und routinemäßig durchgeführter Methoden erhoben:

BSG (84), Thrombozytenzahl pro mm^3 (14), Leukozyten pro mm^3 (17), C-reaktives Protein in ng/ml (37), anti-DNA Titer (5), Anti-ANA Titer (77), Komplement C 3 und C 4 in $\text{mg\%}$ (55), SAAL in Konzentration pro ml durch ELISA (diese Arbeit, Seite 40) und (in Units AA-Kreuzreaktivität) durch die Radiale Immundiffusion (44), nur mit der Ausnahme, daß Kaninchen-anti-AA Antiserum (48) verwendet wurde. Die unterschiedlichen Daten der 22 SLE-Patienten wurden statistisch mit der anti-AA Aktivität nach der Methode von Bravals-Person (87) verglichen.

3.17. Hemmung von anti-AA Antikörpern durch gereinigtes Protein AA

Um zu testen, ob die AA-Bindungsfähigkeit der SLE-Seren durch Protein AA geblockt werden kann, wurden 100 μl der Seren von 8 Patienten mit hoher anti-AA Aktivität mit je 0,1 mg gereinigtem Protein AA (MOS), gelöst in PBS Tween, für eine Stunde bei RT inkubiert. Die verbliebene anti-AA Aktivität wurde mit Hilfe des ELISA-Tests zur Quantifizierung von Autoantikörpern gegen AA (Seite 42) in einer Verdünnung der Seren von 1/10, 1/30, 1/100, 1/300 in PBS Tween gemessen.

4. Resultate

4.1. Auswahl der Mikrotiter-Platten

4.1.1. Vergleich unterschiedlicher Typen von Polystyrol-Mikrotiter-Platten

Um eine Auswahl für die auf dem Markt erhältlichen Mikrotiter-Platten zu treffen, wurden Polystyrol-Platten der

Firmen Nunc (Wiesbaden), Flow (Meckenheim) und Dynatech (Plochingen) hinsichtlich ihrer Proteinbindungsfähigkeit überprüft. Unterschiedliche Konzentrationen von affinitätschromatographisch gereinigtem Kaninchen-anti-Maus IgG (Seite 22) wurden hierzu an die Platte adsorbiert. Es folgte die Inkubation von 1/500 Peroxidase-markiertem Maus IgG (Seite 33) in PBS, pH 7,2. Nach Zugabe der Chromogen-Substratlösung (4 mmol ABTS + 1,47 mmol Perborat in 10 ml Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,08) wurde nach 20 min die Absorption bei 420 nm gemessen. Es zeigte sich, daß unter den angewandten Bedingungen die Polystyrol-Platte der Firma Dynatech die größte Proteinbindungsfähigkeit hat, wie in Abb. 12 (Seite 46) gezeigt.

4.1.2. Vergleich unterschiedlicher Chargennummern der Polystyrol-Platte von Dynatech

Die Proteinbindungsfähigkeit verschiedener Chargen der Polystyrol-Platte der Firma Dynatech (Plochingen) wurde überprüft. Um die Stabilität der Absorption von Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen IgG (Seite 32) zu prüfen, wurden die Platten nach Inkubation mit 10% normalem Schaf Serum in PBS, pH 7,2 geblockt. Die erhaltenen Meßwerte sind in Abb. 13 (Seite 47) illustriert. Sie machen die Variabilität der Bindungsfähigkeit deutlich, d.h., die einzelnen Chargen binden Proteine in unterschiedlicher Menge im unteren Konzentrationsbereich. Die Streuung der Meßwerte an verschiedenen Stellen auf einer einzigen Platte ist in Abb. 14 (Seite 48) dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß die

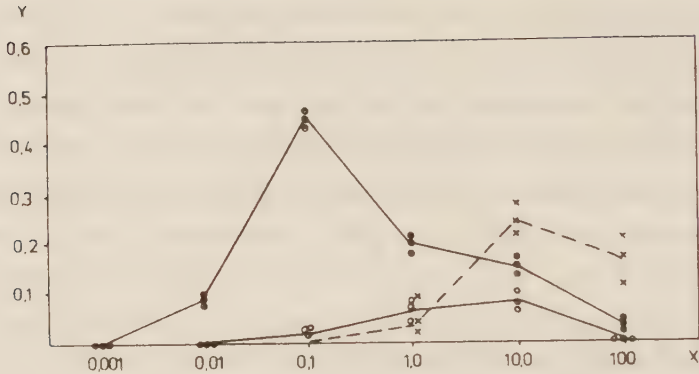


Abb. 12: Adsorption von Antikörperlösungen an unterschiedliche Mikrotiter-Platten

Kaninchen-anti-Maus IgG wurde in angegebenen Konzentrationen (Abzisse) adsorbiert. Danach wurde Peroxidase-markiertes Maus IgG gebunden. Chromogen-Substrat-Inkubationszeit: 20 min.

- Polystyrol-Mikrotiter-Platte: Dynatech
- Polystyrol-Mikrotiter-Platte: Flow
- × Polystyrol-Mikrotiter-Platte: Nunc

X: Kaninchen-anti-Maus IgG ($\mu\text{g/ml}$)

Y: O.D. bei 420 nm

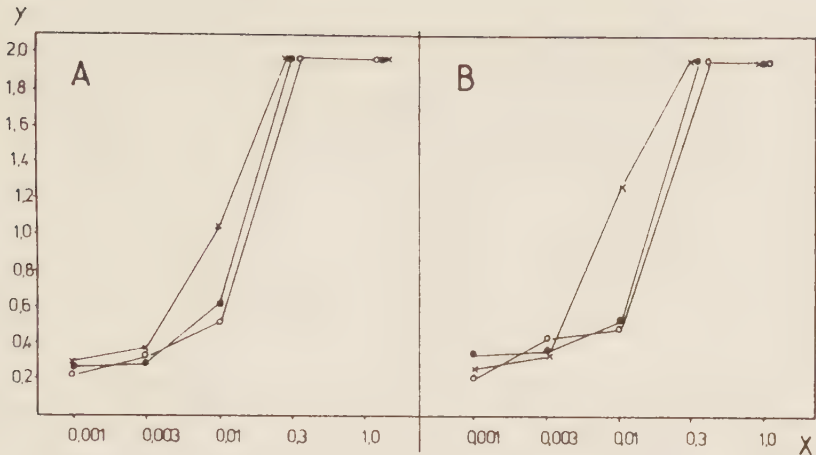


Abb. 13: Proteinbindungsfähigkeit der Mikrotiter-Platten

Inkubation der Platten mit einer Verdünnungsreihe von Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen IgG. Anschließendes Blocken mit 10% normalem Schaf Serum in PBS pH = 7,2 und Peroxidasereaktion (s. oben).

A x Charchennummer 431250

● Charchennummer 730933

○ Charchennummer M 85

B x Charchennummer 300279

● Charchennummer M 89

○ Charchennummer M 90

X: Peroxidase-markiertes Schaf-anti-Kaninchen Immunglobulin ($\mu\text{g/ml}$)

Y: O.D. bei 420 nm

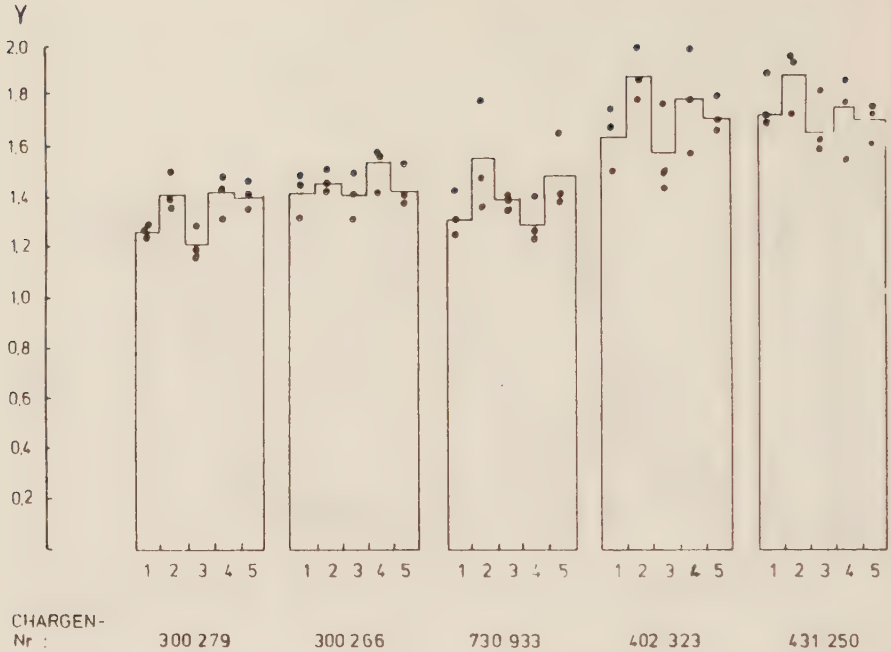


Abb. 14: Proteinbindungsfähigkeit auf unterschiedlichen Polystyrol-Platten und definierten Stellen auf einer Platte

Inkubation der Platten mit 1/400 Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Maus IgG.

Die Höhe der Säulen bilden den Mittelwert von Dreifachbestimmungen. Die Einzelwerte sind als Punkte angegeben. Jede Säule repräsentiert eine Bestimmungsserie auf einer Platte. Die Testsäulen 1-5 repräsentieren die Positionen 1 = A 2,3,4; 2 = A 10,11,12; 3 = D 5,6,7; 4 = H 2,3,4; 5 = H 10,11,12 auf der Platte.

Y: O.D. bei 420 nm

Meßwerte der gleichen Probe in den einzelnen Abschnitten einer einzigen Platte schwanken können. Diese Schwankungen wurden in % des Mittelwertes errechnet und in Tab. 1 (Seite 50) wiedergegeben. Wenn nun die einzelnen Platten im ELISA-Test zur Quantifizierung von Maus IgG (s.o.) in einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ Maus IgG eingesetzt werden, zeigen die Meßwerte der Platte Nr. 431250 die höchste Absorption (Abb. 15, Seite 51). Da die Streuung der Meßwerte jedoch höher als bei der Platte Nr. 300279 waren, wurde letztere für alle weiteren Experimente eingesetzt.

4.1.3. Vergleich von Mikrotiter-Platten aus Polystyrol und PVC

Die Proteinbindungsfähigkeit von Mikrotiter-Platten aus Polystyrol im Vergleich zu denen aus PVC wurde mit Hilfe von Standardkurven zur Quantifizierung von AA (siehe Seite 41) untersucht. Wie Abb. 16 auf Seite 52 zeigt, wurden auf der Polystyrol-Platte weit höhere Absorptionswerte erzielt, als auf der PVC-Platte. Im Gegensatz dazu war die Mikrotiter-Platte aus PVC der aus Polystyrol beim Einsatz zur Quantifizierung von SAAL unter den verwendeten Bedingungen überlegen (siehe Abb. 17, Seite 53).

4.2. Adsorption von Immunglobulinen an die feste Phase

4.2.1. Einfluß des pH-Wertes

Die Adsorption von Immunglobulinen an die feste Phase wurde in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt, wie z.B. in PBS, pH 7,2, Barbitalpuffer, pH 8,6 und Carbonatpuffer, pH 9,6. Wie in Abb. 18 auf Seite 54 gezeigt, erwies

Tabelle 1: Proteinbindungsfähigkeit von Polystyrol-Mikro-
titer-Platten unterschiedlicher Chargen

Chargennummer	Variabilität der Meßwerte auf einer Platte	
	Proben unmittelbar nebeneinander	Proben über die Platte verteilt
300279	8 % ^x	14 % ^{xx}
300266	12 %	11 %
730933	13 %	14 %
402323	20 %	21 %
431250	15 %	16 %

x ermittelt aus den Meßwerte der Mehrfachbestimmungen

xx Zahlen stellen die maximale Differenz der Meßwerte in %
dar, wobei der höchste Meßwert mit 100% angesetzt wurde.

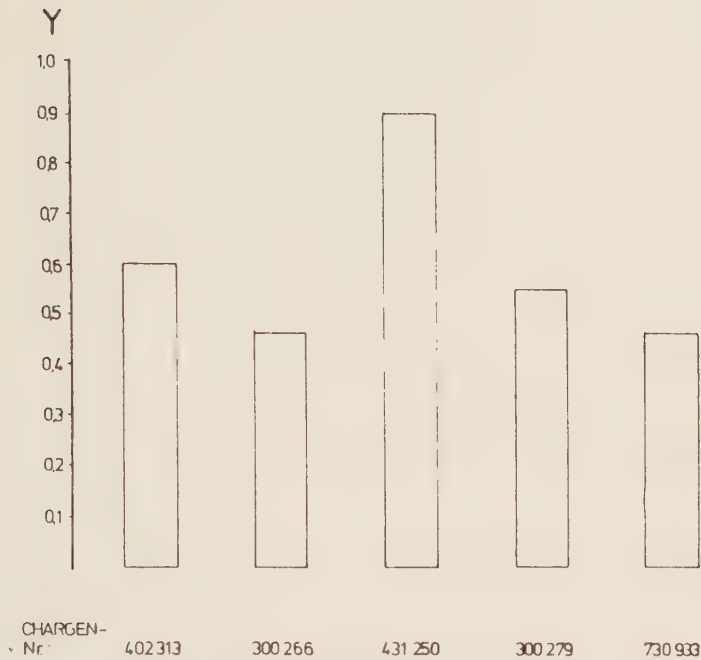


Abb. 15: ELISA zur Quantifizierung von Maus IgG

An die Platten wurde affinitäts-gereinigtes Kaninchen-anti-Maus IgG adsorbiert, gefolgt von Inkubation von 2 $\mu\text{g/ml}$ Maus IgG und anschließend von Peroxidase-markiertem Kaninchen-anti-Maus IgG.

Y: O.D. bei 420 nm

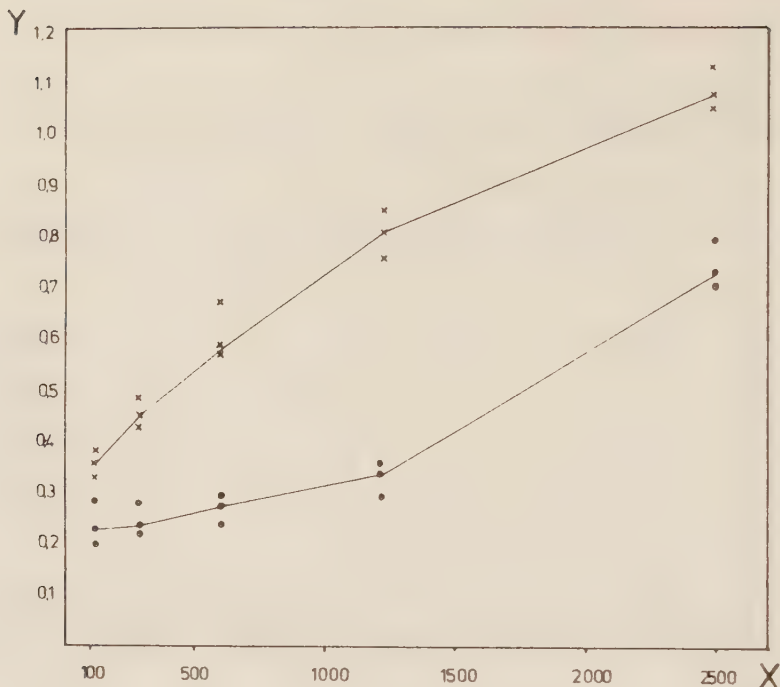


Abb. 16: Standardkurve zur Quantifizierung von AA, Vergleich zweier Platten

Nach Adsorption von Schaf-anti-AA an die Platten folgte die Inkubation von Protein AA. Die Menge des gebundenen Proteins AA wurde mit Hilfe eines Kaninchen-anti-AA Serums und eines Peroxidase-markierten Schaf-anti-Kaninchen IgGs gemessen.

X = Polystyrolplatte (Dynatech; Chargennummer: 431250)

● = PVC-Platte (Dynatech; flexible Platte)

X: AA (ng/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

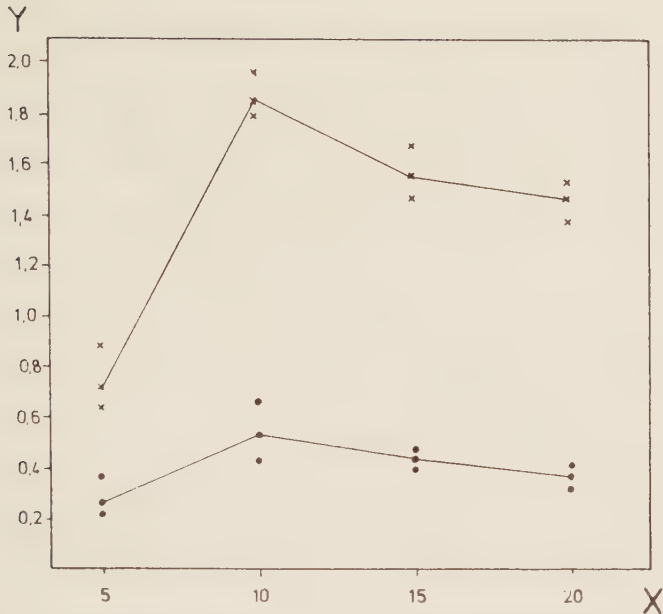


Abb. 17: Absorption unterschiedlicher AK-Konzentrationen zur Quantifizierung von SAAL

Die Mikrotiter-Platten waren mit Schaf-anti-SAAL in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Abszisse) inkubiert, gefolgt von 3 µg/ml SAAL und danach von Peroxidase-markiertem Schaf-anti-SAAL Konjugat.

x = PVC-Platte (Dynatech; flexible Platte)

• = Polystyrol-Platte (Dynatech; Chargennummer: 431250)

X: Schaf-anti-SAAL (µg/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

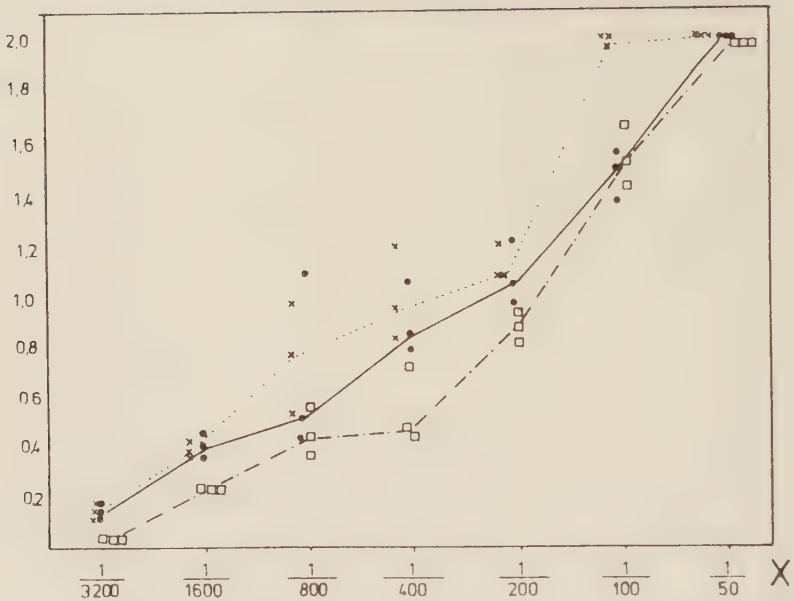


Abb. 18: Einfluß des pH-Wertes auf die Bindung von IgG an PVC

Die Adsorption von Schaf-anti-AA an die Platte wurde in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Es folgte nacheinander die Inkubation von AA, Kaninchen-anti-AA und die einer Verdünnungsreihe von Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen IgG.

Die Kurve stellt den Mittelwert aus Dreifachbestimmungen dar.

X = Barbitalspuffer pH = 8,6

● = PBS pH = 7,2

Δ = Carbonatpuffer pH = 9,6

X: Peroxidase-markiertes Schaf-anti-Kaninchen IgG (Verdünnung)

Y: O.D. bei 420 nm

sich für den ELISA zur Quantifizierung von AA (s.o.) Barbitalt-puffer, pH 8,6, zur Verdünnung des zu adsorbierenden Immunglobulins am geeignetsten. Beim Einsatz von Barbitalt-puffern unterschiedlicher molarer Konzentration lieferte der Puffer in einer Konzentration von 0,3 molar die höchste Adsorption (Abb. 19, Seite 56).

4.2.2. Einfluß der Konzentration der Immunglobuline

Der Einfluß der Konzentration der Immunglobuline auf die Adsorption an die feste Phase ist anhand des ELISA zur Quantifizierung von AA (s.o.) dargestellt. Wie aus Abb. 20 auf Seite 57 hervorgeht, liegt das Adsorptionsoptimum für Immunglobuline bei $1 \mu\text{g/ml}$. Es stellt sich die Frage, bei welcher adsorbierten Immunglobulinmenge AA-Protein am besten gemessen werden kann. Wie Abb. 19 (Seite 56) zeigt, fällt die optimale Meßfähigkeit für AA mit dem Maximum der Anti-AA-Adsorption an die Platte zusammen.

4.3. Waschvorgang

Zur Entfernung der nicht an die feste Phase gebundenen Reaktanten wurden unterschiedliche Waschlösungen eingesetzt. Das Ziel war, herauszufinden, ob die billigste Waschlösung, nämlich Leitungswasser, verwendbar ist. Dazu wurde PBS Tween und Leitungswasser verglichen. Wie Abb. 21 auf Seite 58 zeigt, ergaben beide Waschlösungen einen nahezu identischen Hintergrund und ähnlich hohe Meßwerte. Möglicherweise ist Leitungswasser bei bestimmten Enzymimmunoassays vorzuziehen. Dies wurde am Beispiel des ELISA zur Quantifizierung von SAAL (Seite 40) demonstriert. Aus diesem Grund wurde für die

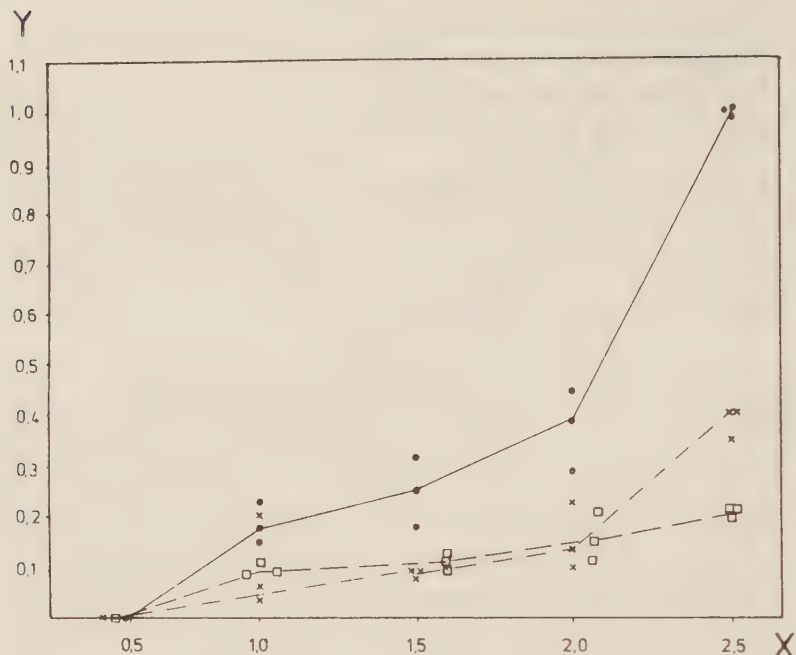


Abb. 19: Einfluß der molaren Stärke des Barbitolpuffers, pH 8,6 auf die Adsorption von IgG

Die Adsorption von Schaf-anti-AA wurde in Barbitolpuffern pH 8,6 unterschiedlicher Molarität durchgeführt. Nachweis wie in Abb. 18.

- Barbitolpuffer pH = 8,6 0,3 M
- × Barbitolpuffer pH = 8,6 0,1 M verdünnt in Aqua dest.
- △ Barbitolpuffer pH = 8,6 0,3 M verdünnt in Aqua dest.

X: AA (µg/ml)
Y: O.D. bei 420 nm

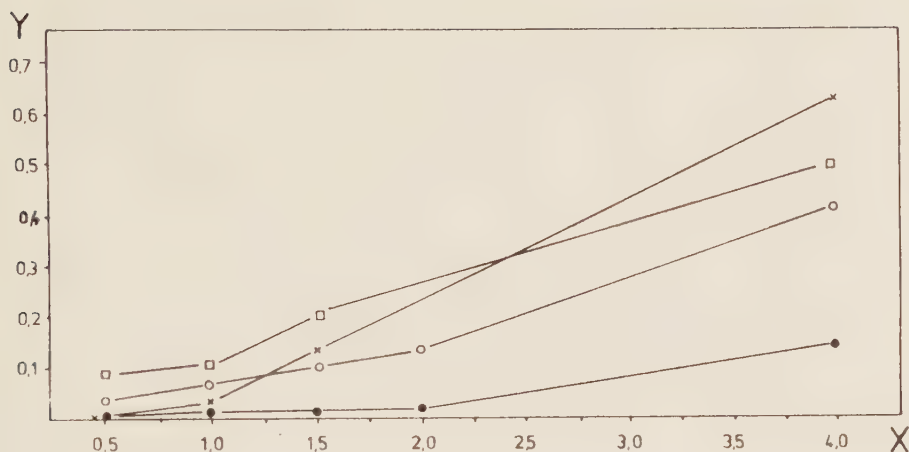


Abb. 20: Abhängigkeit der Immunglobulinadsorption von der Konzentration der Immunglobuline

Die Adsorption von gereinigtem Schaf-anti-AA Immunglobulin an eine Polystyrol-Mikrotiter-Platte erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen. Nachweis wie Abb. 18. Die Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen (s.o.)

Die Menge der spezifischen Immunglobuline wurde mit Hilfe des Antigens (Protein AA) gemessen.

- = 0,1 µg/ml
- × = 1,0 µg/ml
- = 0,5 µg/ml
- Δ = 1,5 µg/ml

X: AA (µg/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

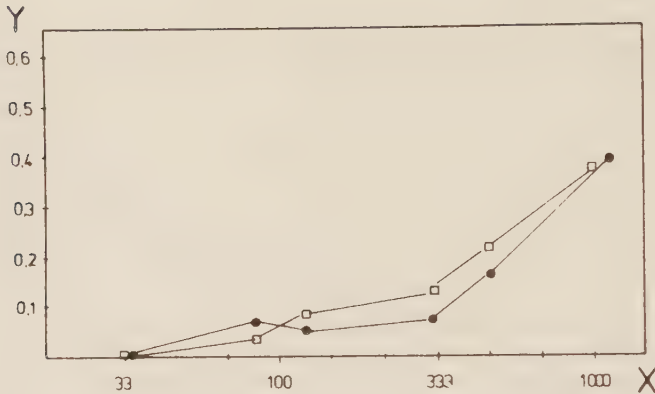


Abb. 21: Einfluß von PBS + Tween und Leitungswasser auf die Standardkurve zur Quantifizierung von SAAL

Nach Adsorption von affinitätschromatographisch gereinigtem Schaf-anti-SAAL Immnglobulin an die Platte folgte die Bindung unterschiedlicher Konzentrationen von SAAL gefolgt von 1/900 Peroxidase-markiertem Schaf-anti-SAAL Immunglobulin. Die Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar. Hintergrundfärbung war 0.000-0.020 bei 420 nm.

Waschlösungen: □ = Leitungswasser, pH 6,3

● = PBS + 0,05% Tween 20, pH 7,2

X: SAAL (µg/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

meisten Versuche Leitungswasser als Waschlösung verwendet.

4.4. Blocken

Unter Blocken versteht man die Sättigung von Protein-bindenden Stellen der festen Phase durch Adsorption bestimmter Substanzen, die Blockmittel genannt werden. Blockmittel werden eingesetzt, um die nichtspezifische Bindung möglichst gering zu halten. Hierdurch wird das spezifische Signal meßbar. Zum Blocken wurden z.B. Seren, Gelatine, Casein, Bovine Serum Albumin und PBS Tween eingesetzt. Der Einfluß von unterschiedlichen Blockmitteln ist exemplarisch für den ELISA zum Messen von Anti-AA-AK in Abb. 22 auf Seite 60 dargestellt. Blocken mit PBS Tween war bei diesem ELISA nicht ausreichend, da ein hohes Maß unspezifischer Bindung resultierte. Bei Verwendung von Casein als Blockmittel war der Hintergrund am niedrigsten, wobei mit 0,5% Casein in Tween die niedrigste unspezifische Bindung gemessen wurde. Zieht man die Hintergrundwerte von den gemessenen Werten ab, so erhält man die Standardkurve für das spezifische Signal. Die Empfindlichkeit des Tests ist bei zu hohen Meßwerten vermindert, da die maximale Höhe der Meßwerte limitiert ist (sie liegt bei 2000). Daher muß auch der Hintergrund niedrig sein, um den Unterschied zum spezifischen Signal zu vergrößern.

4.5. Abhängigkeit der spezifischen Bindung vom pH-Wert und der Salzkonzentration

Hier soll die spezifische Antigen-Bindung an das an die Platte adsorbierte IgG unter Einfluß der Wasserstoffionen-

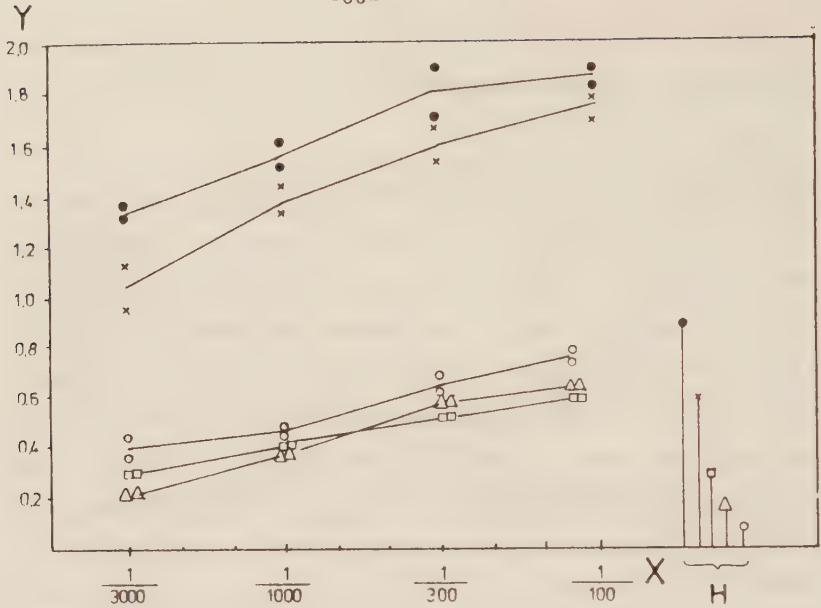


Abb. 22: Einfluß von Blockmitteln auf die Adsorption und den Hintergrund beim Messen von anti-AA-Antikörpern

Das Blocken wurde durchgeführt mit den oben genannten Blockmitteln in folgendem Testansatz:

1. Adsorption von Schaf-anti-AA an die Platte
 2. Bindung von AA
 3. Blocken (siehe oben)
 4. Kaninchen-anti-AA in unterschiedlicher Konzentration (Abszisse)
 5. Peroxidase markiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG
- Die Kurven repräsentieren Mittelwerte von Doppelbestimmungen

Blockmittel: ● ohne Blockmittel
 x PBS Tween
 □ 0,1% Casein in PBS Tween
 ○ 0,5% Casein in PBS Tween
 △ 1,0% Casein in PBS Tween

H: Hintergrund (unspezifische Bindung ohne den zu messenden Antikörper)

X: Kaninchen-anti-AA (Verdünnung)
 Y: O.D. bei 420 nm

und Salzkonzentration untersucht werden. Dazu wurde Schaf-anti-AA an die Platte adsorbiert und anschließend die AA-Bindung in einer Antigen-Verdünnungsreihe gemessen. (Die Einzelheiten des Tests wurden bereits bei dem ELISA zur Quantifizierung von AA auf Seite 41 erläutert). Die Verdünnungsreihe von AA wurde in verschiedenen Puffern durchgeführt. Die in Abb. 23 auf Seite 62 dargestellten Meßergebnisse zeigen, daß im Bereich von 350-1400 ng/ml AA die Zunahme der Meßwerte, gemessen an der Steigung der Standardkurve, dann am höchsten waren, wenn AA in Carbonatpuffer + 0,05% Tween 20, pH 9,6 gelöst war. Für die weiteren Versuche wurde jedoch PBS Tween, pH 7,2 als Lösungsmittel gewählt, da auch in niedrigen Bereichen der Standardkurve (von 21-350 ng/ml AA) eher lineare Abhängigkeit der Adsorptionswerte von der AA-Konzentration gefunden wurde. Der Einfluß der spezifischen Bindung von AA in Abhängigkeit vom Salzgehalt ist in Abb. 24 auf Seite 63 dargestellt. Daraus geht hervor, daß die stärkste spezifische Bindung von AA in PBS Tween, pH 7,2 und 2,7% NaCl erfolgte.

4.6. Auswahl des Chromogens

Enzymaktivitäten können indirekt über chromogene Substanzen gemessen werden, wenn die Farbentwicklung proportional der Enzymaktivität ist. Die Chromogene werden durch ein Sauerstoffradikal, das über eine Peroxidase katalysierte H_2O_2 -Abspaltung entsteht, oxidiert. Die oxidierte Form der Chromogene ändert die Farbtintensität durch mesomeriestabilisierte konjugierte Doppelbindungen. Die folgenden Substrate

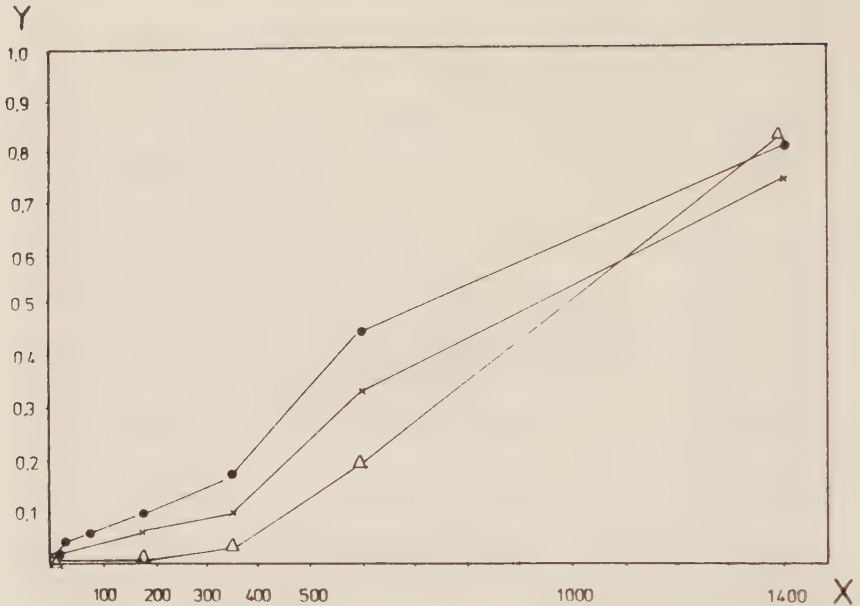


Abb. 23: Einfluß des pH-Wertes auf die Adsorption von AA an die feste Phase

Schaf-anti-AA wurde an eine Polystyrolplatte adsorbiert. Die spezifische Bindung von AA an diesen Antikörper wurde dann unter unterschiedlichen Bedingungen (siehe oben) mit einer Verdünnungsreihe von AA in verschiedenen Puffern durchgeführt. Es folgte Inkubation von Kaninchen-anti-AA Serum gefolgt von Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen IgG. Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

● PBS + 0,05% Tween 20, pH 7,2

× Barbitallpuffer + 0,05% Tween 20, pH 8,6

△ Carbonatpuffer + 0,05% Tween 20, pH 9,6

X: AA (ng/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

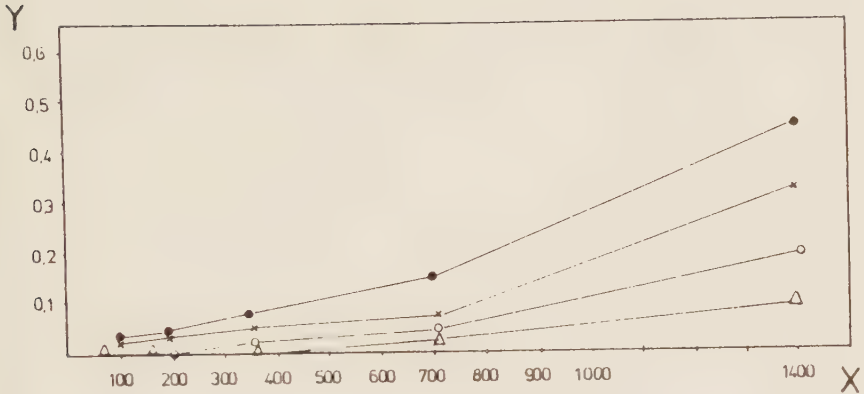


Abb. 24: Einfluß der Salzkonzentration auf die Bindung von AA

Versuchsdurchführung wie in Abb. 23.

- Δ PBS Tween + 0,9% NaCl
- PBS Tween + 1,8% NaCl
- PBS Tween + 2,7% NaCl
- × PBS Tween + 3,6% NaCl

X: AA (ng/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

wurden miteinander verglichen: 2,2'-Azino-di (3-Äthyl-Benz-thiazolin-Sulfonat) (ABTS), ortho-Phenylendiamin (OPD) und 5-Amino-Salizylsäure (AS). Die Substrate wurden in ihren optimalen Versuchsbedingungen eingesetzt, die im einzelnen ermittelt wurden als: 0,4 mmol/l ABTS gelöst in Phosphat-Citratpuffer, pH 5,1; 0,5 mmol/l OPD gelöst in Phosphatpuffer, pH 6,0; 0,4 mmol/l AS gelöst in Phosphatpuffer, pH 6,0. Die Adsorptionsmaxima lagen für ABTS bei 420 nm, für OPD und AS bei 450 nm. Als Substrat wurde 1 μ l/ml 30% H_2O_2 mit einer Endkonzentration von 0,03% zugesetzt. Die mit den verschiedenen Chromogenen gemessenen Absorptionen sind als Funktion der Enzymkonzentration in Abb. 25 auf Seite 65 dargestellt. Man sieht, daß ABTS im niedrigen Konzentrationsbereich am sensibelsten reagiert. Daher wurde ABTS für die Tests dieser Arbeit verwendet.

4.7. Vergleich der Peroxidase-Immunglobulin-Konjugate

Im Verlauf der kovalenten Bindung von HRP an AK ist mit einer Aktivitätseinbuße sowohl der Antikörperbindungsfähigkeit als auch der Enzymaktivität zu rechnen. Möglichst milde Versuchsbedingungen wurden daher bei den hier durchgeführten Enzymkopplungen gewählt (Seite 31). Sowohl die HRP- als auch die IgG-Konzentration der einzelnen Fraktionen wurde spektroskopisch bestimmt und das molare Verhältnis von IgG zu HRP ermittelt. Die hier hergestellten Kopplungen hatten ein Verhältnis von IgG zu HRP von 0,49 - 3,58. Die hergestellten Enzymkonjugate wurden auch funktionell in der indirekten Immunperoxidase-Technik und im ELISA auf Peroxi-

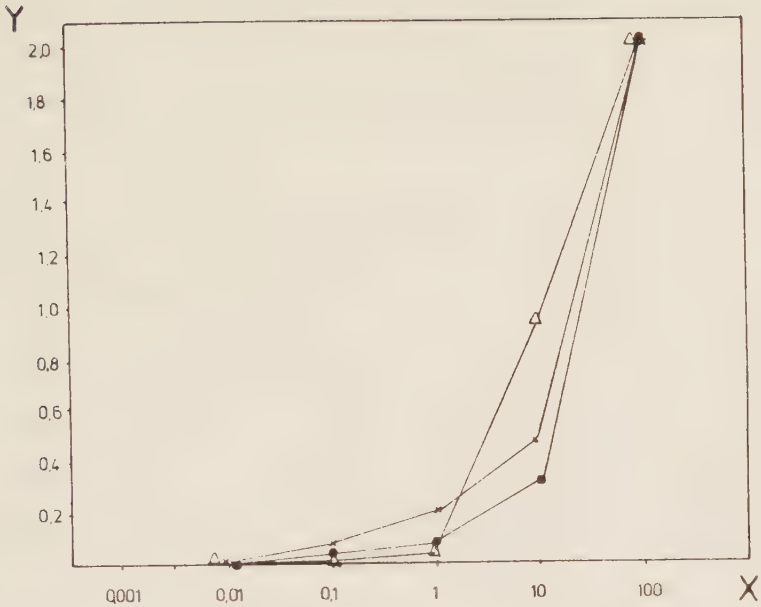


Abb. 25: Umsatz von Chromogenen durch unterschiedliche Konzentrationen von Peroxidase bei konstanter H_2O_2 Konzentration

Chromogen-Enzym-Inkubationszeit: 50 Minuten
Menge der Substratlösung: 0.1 ml

- AS, Absorption bei 450 nm
- Δ OPD, Absorption bei 450 nm
- x AbTS, Absorption bei 420 nm

X: Meerrettig-Peroxidase (ng)
Y: O.D. bei 420 nm

dase und Antikörperaktivität untersucht. Ein Maß für die Güte der Enzymkopplungen war hierbei die Höhe der Verdünnung, mit der das jeweilige Konjugat eine optimale Reaktion lieferte.

4.7.1. Peroxidase- und Immunglobulin-Verteilung

Das Rohkonjugat von Peroxidase und IgG (Seite 31) wurde über Sephacryl S-300 (Seite 16) der Größe nach getrennt, um die Konjugate sowohl von ungebundenem Immunglobulin als auch von ungebundener Peroxidase zu trennen. Die Proteinkonzentration der erhaltenen Fraktionen wurde nach Lowry (51) und die Peroxidasekonzentration bei 400 nm photometrisch bestimmt. Ein typisches Beispiel für die GDA-Methode ist in Abb. 26 auf Seite 67 und eines für die NaJO_4 -Methode in Abb. 27 auf Seite 68 wiedergegeben. Die Aktivität von IgG und die von HRP wurde in der zweidimensionalen Immundiffusion bestimmt. Dabei wurde HRP mit anti-HRP präzipitiert und die Anwesenheit von Peroxidase anhand der braunen Färbung der Präzipitatlinie sichtbar gemacht. Dazu wurde die DAB-Färbemethode (58) angewendet (50 mg DAB in 100 ml PBS + 100 μ l 30% H_2O_2). Außerdem kann auch in Abwesenheit von Antiperoxidase die zwischen Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase und Kaninchen IgG (Abb. 26) und Schaf-anti-SAAL-Peroxidase und SAAL (Abb. 27) erfolgte immunologische Reaktion mit Hilfe der Peroxidase-reaktion (s.o.) nachgewiesen werden. In beiden dargestellten Präparationen und in anderen Präparationen konnte auf diese Weise der qualitative Beweis einer kovalenten Bindung zwischen aktivem Immunglobulin und aktiver Peroxidase erbracht

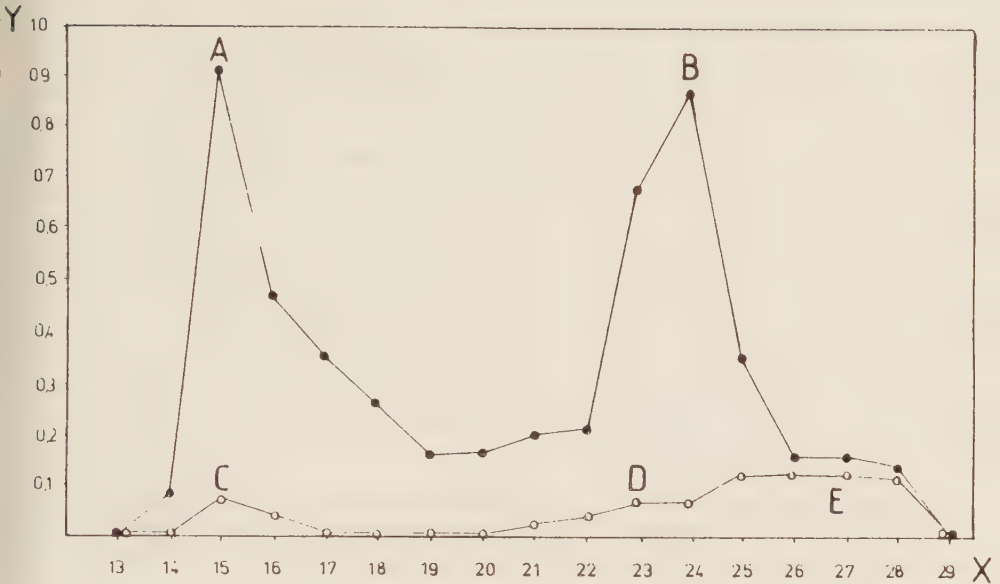


Abb. 26: Gelfiltration einer Präparation von Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen IgG (nach der GDA-Methode)

Geltyp: Sephacryl S 300 (84 x 2 cm, 40 - 105 nm)
 Tropfenzahl: 120/h, Tropfenzahl/Fraktion: 120
 Hydrostatischer Druck: 70 cm Wassersäule

- Protein (mg/ml)
- Peroxidase (mg/ml)
- A IgG-Polymere
- B IgG-Monomere
- C Höhere Peroxidase-IgG-Polymere
- D IgG-Peroxidase-Komplexe
- E Peroxidase-Monomere

X: Fraktions-Zahl

Y: Protein-/Peroxidase-Konzentration (mg/ml)

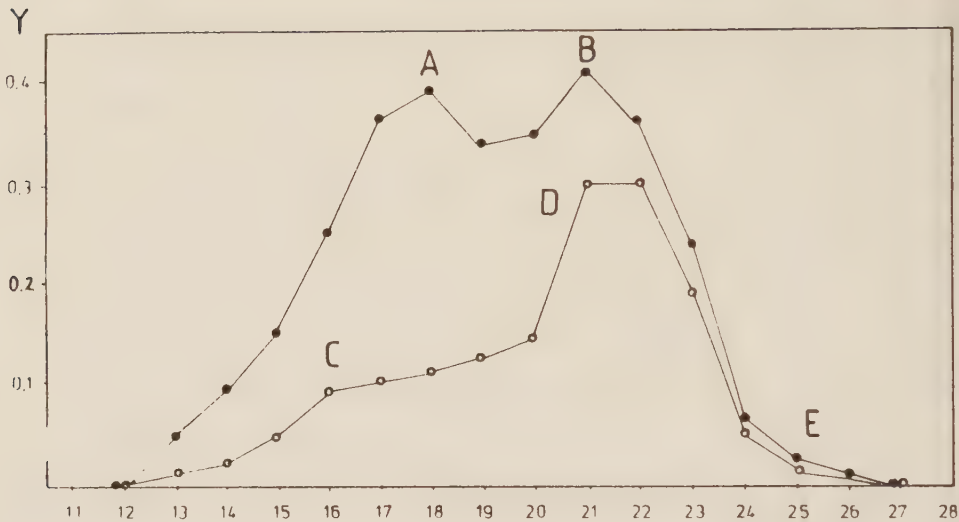


Abb. 27: Gelfiltration einer Enzymkopplung von Peroxidase mit Schaf-anti-SAAL (NaJO_4 -Methode)

Geltyp: Sephacryl S-300 (84 x 2 cm, 40 - 105 nm)
 Tropfenzahl: 120/h, Tropfenzahl/Fraktion: 120
 Hydrostatischer Druck: 70 cm Wassersäule

- Protein (mg/ml)
- mg/ml Peroxidase
- A IgG-Polymere und IgG-Peroxidase-Konjugat
- B IgG-Peroxidase-Konjugat
- C Peroxidase-IgG-Komplexe unterschiedlicher Größe
- E Peroxidase-Monomere in geringer Konzentration

X: Fraktions-Zahl

Y: Protein-/Peroxidase-Konzentration (mg/ml)

werden.

Wie hoch der Anteil an gebundener und nicht gebundener Peroxidase und wie weit der Antikörper noch aktiv ist, konnte ebenfalls mit Hilfe der zweidimensionalen Immundiffusion abgeschätzt werden.

So wurden die aktiven Konjugate in den Fraktionen 21-22 von Abb. 26 (und in den Fraktionen 21-23 von Abb. 27) mit Hilfe der Immundiffusion nachgewiesen (in Klammern jeweils die entsprechenden Fraktionen von Abb. 27). Eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit präparierten Enzymkopplungen zeigt Tabelle 1 auf Seite 71. Diese Fraktionen stellen ideale Konjugate dar, da anti-Peroxidase und anti-Immunglobulin eine Linie auf Identität bilden. Die gute Trennung von IgG Monomeren und freier Peroxidase ist dadurch erklärt, daß die HRP-IgG-Konjugate größer sind als die Monomere und in der Gelfiltration vor den nicht gekoppelten monomeren IgG-Molekülen eluiert werden. Die Fraktionen 23-24 (23-25) enthalten ebenfalls aktive Konjugate. Allerdings sieht man hier, daß anti-HRP über anti-IgG spornt, oder auch eine unabhängige Präzipitationslinie von Peroxidase. Dies zeigt ebenfalls, daß unkonjugierte HRP-Moleküle vorhanden sind, da sie unabhängig von der IgG-Linie präzipitieren. Die Frage, ob die Präzipitatlinie zwischen Konjugat und anti-IgG HRP Aktivität aufweist, wurde mit einer erfolgten DAB-Reaktion (siehe oben) positiv beantwortet. Die Fraktionen 27-28 (25-26) enthalten nahezu nur HRP, wie ebenfalls aus der Immundiffusion hervorgeht. Damit ist der Nachweis geliefert, daß bestimmte Fraktionen Konjugate zwischen Antikörpern und HRP

enthalten und daß sowohl Antikörper- wie auch HRP-Aktivität nachgewiesen werden können. Damit sind diese Konjugate bei der Immunperoxidase-Methode wie auch im Mikro-ELISA einsetzbar.

4.7.2. Molares Verhältnis von Immunglobulin zu Peroxidase

Aus Tab. 1 auf Seite 71 geht hervor, daß unter den Enzymkonjugationen erhebliche Schwankungen im molaren Verhältnis von HRP zu IgG bestehen. Eine deutliche Differenz der molaren Verhältnisse von 0,49-3,58 besteht zwischen den Enzymkopplungen, die mit GDA-aktivierter HRP durchgeführt wurden (Tab. 1, I, II, III). Demgegenüber konnten mit der NaJO_4 -Methode mit 0,55, 0,77 und 0,81 eher reproduzierbare Molekülverhältnisse zwischen HRP und IgG erzielt werden (Tab. 1, IV, V, VI). Die molare Verteilung zwischen HRP und IgG hat erhebliche Auswirkungen auf die Einsetzbarkeit der Konjugate, wobei die NaJO_4 -Präparationen die besten Ergebnisse lieferten (siehe unten).

4.7.3. Ausbeute von Immunglobulin und Peroxidase-Konjugat

Der Anteil der im Konjugat wiedergefundenen Proteine im Verhältnis zur Ausgangsmenge wurde für die einzelnen Präparationen für IgG und HRP bestimmt und in Tab. 2 auf Seite 72 dargestellt. Mit der NaJO_4 -Methode konnten 22,5 - 43,0% der Ausgangsmenge HRP an IgG gebunden werden (Tab. 2, IV-VI), wohingegen bei der GDA-Methode nur 0,5-3,4% HRP (Tab. 2, I-III) konjugiert wurden. Bei der modifizierten NaJO_4 -Methode konnten 46,3% und 66,5% des gebundenen IgG im Verhältnis zur Ausgangsmenge (Tab. 2, V und VI) und bei der

Tab. 1 Protein- und Peroxidase-Gehalt der Enzymkopplungen

Nummer	Kopplungsmethode	Peroxidase- Kopplung an	Protein (mg/ml)	Peroxidase (mg/ml)	Molare Ratio Ig/Peroxidase
I	GDA	Schaf-anti- Kaninchen IgG	0,4	0,14	0,49
II	GDA	Schaf-anti- Kaninchen IgG	0,6	0,04	3,58
III	GDA	Maus IgG	0,2	0,02	2,30
IV	NaIO ₄	Kaninchen-anti- Maus IgG	0,24	0,09	0,55
V	NaIO ₄ (modifiz.)	Schaf-anti-SAL	5,7	1,4	0,77
VI	NaIO ₄ (modifiz.)	Kaninchen-anti- Human IgG	6,8	1,6	0,81
VII	Gekauft (Behring)	Ziege-anti- Kaninchen IgG	0,9	0,10	2,05
VIII	Gekauft (Miles)	Ziege-anti- Kaninchen IgG	1,7	0,30	1,19

Tab. 1 Protein- und Peroxidase-Gehalt der Enzymkopplungen

Nummer	Kopplungsmethode	Peroxidase- Kopplung an	Protein (mg/ml)	Peroxidase (mg/ml)	Molare Ratio IgG/Peroxidase
I	GDA	Schaf-anti- Kaninchen IgG	0,4	0,14	0,49
II	GDA	Schaf-anti- Kaninchen IgG	0,6	0,04	3,58
III	GDA	Maus IgG	0,2	0,02	2,30
IV	Na ₂ O ₄	Kaninchen-anti- Maus IgG	0,24	0,09	0,55
V	Na ₂ O ₄ (modifiz.)	Schaf-anti-SAL	5,7	1,4	0,77
VI	Na ₂ O ₄ (modifiz.)	Kaninchen-anti- Human IgG	6,8	1,6	0,81
VII	gekauft (Behring)	Ziege-anti- Kaninchen IgG	0,9	0,10	2,05
VIII	gekauft (Miles)	Ziege-anti- Kaninchen IgG	1,7	0,30	1,19

Tab. 2: Ausbeuten bei den Antikörper-Peroxidase Kopplungen

Nummer	Kopplungs- Methode	Zur Kopplung ein- gesetzte Menge in mg Peroxidase	Protein	Konjugat- Präparationen in ml	Konjugierter Anteil im Verhältnis zur Ausgangsmenge Peroxidase	Anteil im Ausgangsmenge Protein
I	GDA	225	75	47,0	3,4%	29,4%
II	GDA	150	50	36,8	0,8%	37,6%
III	GDA	55	18,5	13,1	0,5%	14,1%
IV	NaJO ₄	25	25	45,0	43,0%	16,4%
V	NaJO ₄ (modifiz.)	8	16	1,3	22,5%	46,3%
VI	NaJO ₄ (modifiz.)	10	20	1,9	31,0%	66,5%

Tab. 2: Ausbeuten bei den Antikörper-Peroxidase Kopplungen

Nummer	Kopplungs- Methode	Zur Kopplung ein- gesetzte Menge Peroxidase	in mg Protein	Konjugat- Präparationen in ml	Konjugierter Anteil im Verhältnis zur Ausgangsmenge Peroxidase	Protein
I	GDA	225	75	47,0	3,4%	29,4%
II	GDA	150	50	36,8	0,3%	37,6%
III	GDA	55	18,5	13,1	0,5%	14,1%
IV	NaJO ₄	25	25	45,0	43,0%	16,4%
V	NaJO ₄ (modifiz.)	8	16	1,3	22,5%	46,3%
VI	NaJO ₄ (modifiz.)	10	20	1,9	31,0%	66,5%

NaJO₄-Standard-Methode nur 16,4% der Ausgangsmenge von IgG (Tab. 2, IV) an HRP konjugiert zurückgewonnen werden. Bei der GDA-Methode lagen die Werte bei 14,1, 29,4 und 37,6%.

4.7.4. Einsatz der Peroxidase-Kopplungen in der indirekten Immunperoxidase-Technik

Um die Verwendbarkeit der hergestellten Konjugate zu testen, wurden diese in der indirekten Immunperoxidase-Technik (Seite 35) eingesetzt. Ein Beispiel (Abb. 28, Seite 74) zeigt eine IgG-sezernierende Plasmazell-Linie gemischt mit einer nicht sezernierenden Linie. Die Anfärbung von intrazellulärem IgG zeigt entsprechend bei einzelnen Zellen unterschiedliche Färbung. So wurden einige Zellen sehr stark gefärbt, andere schwächer und wieder andere überhaupt nicht. Die stark gefärbten Zellen sind mittelgroß und stellen reife Plasmazellen dar. Die großen, schwach gefärbten Zellen stellen Plasmoblasten dar. Die nichtgefärbten (kleine und große) repräsentieren nicht sezernierende Plasmazellen, die wohl meist von der nicht sezernierenden Zell-Linie stammen und die als Negativkontrolle in einem Verhältnis von 1:1 den Zellen der IgG-bindenden Linie beigemischt wurden. Unterschiedliche Güte der Konjugate wurde durch die Höhe der möglichen Verdünnung, die noch eine deutliche Anfärbung der Plasmazellen ergab, ermittelt. Die nach der NaJO₄-Methode hergestellten Konjugate konnten in einer Verdünnung von 1/100 - 1/200 und die nach der GDA-Methode mit ungepufferter Lysin-Lösung in einer Verdünnung von 1/50 eingesetzt werden. Die Konjugate nach der GDA-Methode konnten dagegen nur in

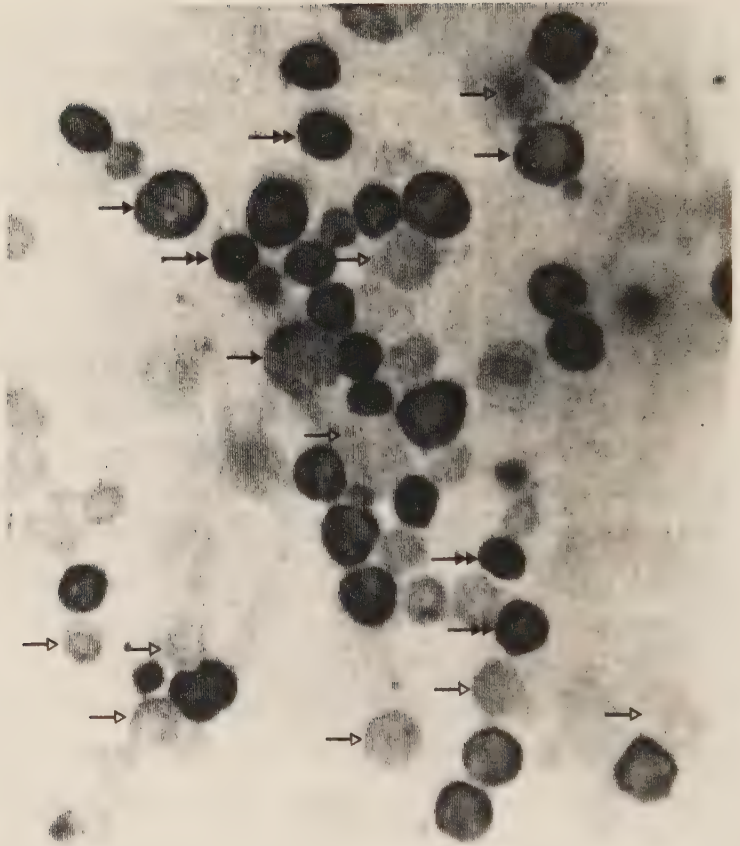


Abb. 28: Indirekte Immunperoxidase-Technik zur Darstellung IgG sezernierender Plasmazellen

- Reife Plasmazelle (stark positiv)
- Plasmo-Blasten (mäßig stark positiv)
- Nicht-sezernierende Plasmazelle (negativ)

einer Konzentration von 1/10 verwendet werden. Die besseren käuflichen HRP-markierten AK (Miles) konnten in der indirekten Immunperoxidase-Technik in einer Verdünnung von 1/100-1/200 verwendet werden. Die neuesten käuflichen und selbst hergestellten Konjugate konnten in dieser Arbeit nicht mehr berücksichtigt werden. Sie zeigten optimale Färbung in einer Verdünnung von etwa 1/4000.

4.7.5. Einsatz der Peroxidasekopplungen im ELISA

Die Verwendbarkeit der Konjugate wurde auch im Mikro-ELISA untersucht. Dazu wurden Verdünnungsstufen der einzelnen Peroxidasekopplungen ermittelt, die beim Einsatz im ELISA optimale Standardkurven ergaben. Die unterschiedlichen Verdünnungsstufen der nach der NaJO_4 -Methode erstellten Peroxidase-markierten Schaf-anti-SAAL (Seite 34) ergaben beispielsweise die in Abb. 29 (Seite 76) wiedergegebenen Standardkurven. Daraus geht hervor, daß höhere Verdünnungen des HRP-markierten AK für hohe Konzentrationen von SAAL optimale Standardkurven ergaben und umgekehrt. Der Verdünnungsgrad der Konjugate, mit dem optimale Standardkurven erzielt werden konnten, bestimmt die Güte der Präparationen. Die nach der NaJO_4 -Methode erstellten Peroxidasekopplungen und die besseren käuflich erworbenen (Miles) konnten im ELISA in einer Konzentration von 1/1000 optimal eingesetzt werden, wohingegen dies bei den nach der GDA-Methode präparierten nur in einer Konzentration von 1/300 möglich war. Die Sensitivität des Assays steigt mit der Höhe der Konzentration des markierten AK (Abb. 30, Seite 77). Die Verdünnungsstufe des

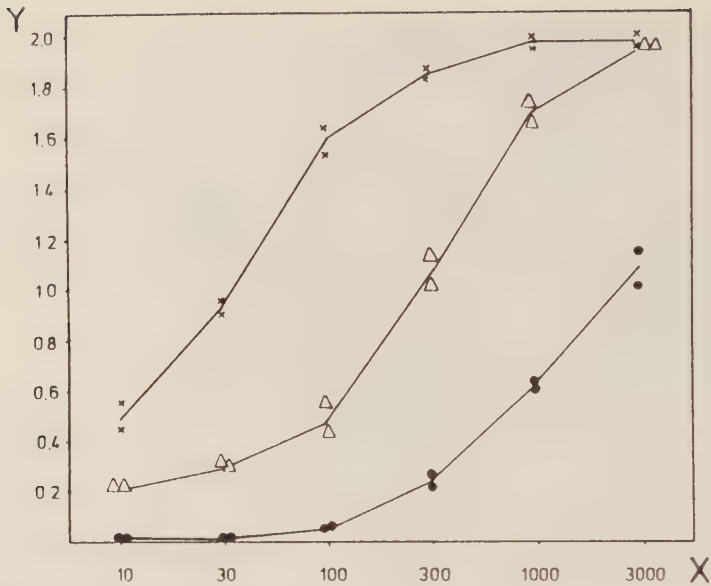


Abb. 29: Absorptionsmaximum als Funktion der Konzentration des Peroxidase-markierten AK und der Konzentration des zu quantifizierenden Ig

Adsorption von Schaf-anti-SAAL mit anschließender Inkubation einer Verdünnungsreihe von jeweils SAAL und von Peroxidase-markiertem Schaf-anti-SAAL.

Chromogen-Substrat-Inkubationszeit: 30 Minuten.

x 1/600
 Δ 1/900 Verdünnung von Peroxidase-markiertem Schaf-
 ● 1/1200 anti-SAAL

X: SAAL (ng/ml)
 Y: O.D. bei 420 nm

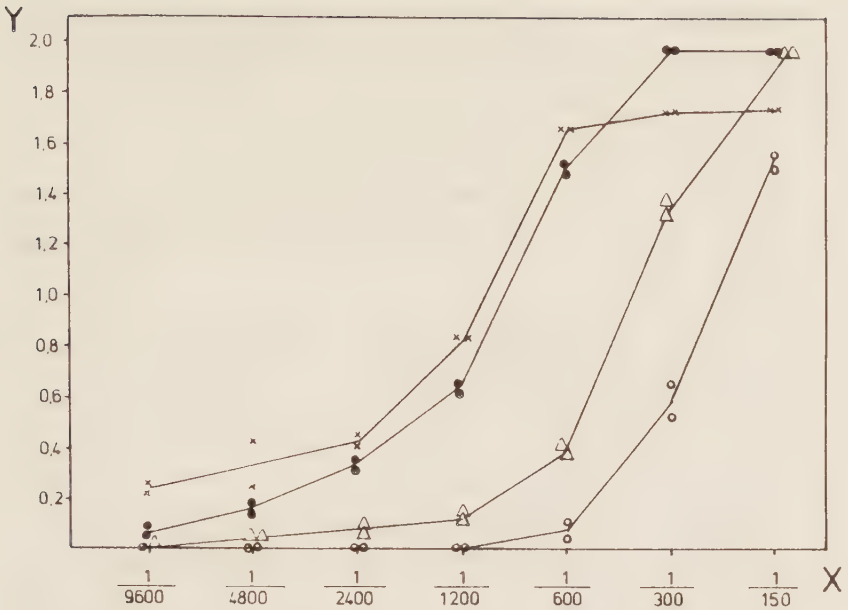


Abb. 30: Absorptionsmaximum in Abhängigkeit von der Konzentration des Peroxidase-markierten IgG und der Inkubationszeit der Substrat-Chromogen-Lösung (ABTS).

Nach Absorption von Schaf-anti-SAAL an die Platten wurden 3 µg/ml SAAL und anschließend eine Verdünnungsreihe von Schaf-anti-SAAL inkubiert.

Substratinkubationszeit:

○ 5 Min.
△ 10 Min.

● 45 Min.
× 24 Std.

X: Schaf-anti-SAAL-Peroxidase Konjugat
(Verdünnung)
Y: O.D. bei 420 nm

Konjugates wurde dann als optimal angesehen, wenn das Absorptionsmaximum nach 30-45 min erreicht war, da dann gut reproduzierbare Werte erzielt wurden. Sollen IgG in ganz geringer Konzentration quantifiziert werden, können bei Verwendung von ABTS als Chromogen auch sehr lange Chromogen-Substrat-Inkubationszeiten angesetzt werden, die dann zu gut auswertbaren Werten führen.

4.8. Preis einer Quantifizierung mit der Mikro-ELISA-Technik

Der Kostenaufwand einer Bestimmung mit dem Mikro-ELISA soll exemplarisch am Beispiel der Quantifizierung von Maus IgG errechnet werden (Tab. 3, Seite 79). Bei den hier durchgeführten Dreifachbestimmungen enthält der Ansatz die Testlösung und eine negative und eine positive Kontrolle ebenfalls in Dreifachbestimmung. Demzufolge können auf einer Mikrotiter-Platte 25 Bestimmungen durchgeführt werden. Der Preis für eine Dreifachbestimmung beläuft sich demnach auf etwa DM 0,15. In diesem Preis sind Personalkosten und der Anschaffungspreis für einen ELISA-Reader und einer Mehrfachpipette nicht enthalten. Dieser Vergleich zeigt, wie gering die materiellen Kosten der Auto-ELISA Tests sind.

4.9. Quantifizierung von Maus IgG

Die Sensibilität des ELISA-Testes soll exemplarisch am Beispiel der Quantifizierung von Maus IgG dargestellt werden. Eine in diesem Assay erzielte Standardkurve ist in Abb. 31 auf Seite 80 wiedergegeben. Der optimale Meßbereich für die Testseren liegt hierbei zwischen 0,450 und 1,00 $\mu\text{g/ml}$ Maus IgG. Von den Testseren wurden Verdünnungsreihen in Carbonat-

Tab. 3 Kostenerstellung zur Durchführung eines Mikro-ELISA-Testes beim ELISA zur Quantifizierung von Maus IgG (Stand 1981) Personalkosten wurden nicht berücksichtigt.

	Verwendung	Preis in DM
1 Mikrotiter-Platte (Material: Polystyrol Fa.: Miles)	feste Phase	2,--
10 ml Kaninchen-anti- Maus IgG (Konz.: 1 g/ml Fa.: Miles)	an die feste Phase adsorbierter AK	0,35
20 µg Maus IgG (Fa.: Sigma)	Erstellen der Standardkurve	0,60
10 ml Peroxidase- markiertes Kaninchen- anti-Maus IgG (Verd.: 1/1000 Fa.: Miles)	spezifischer Enzym-markierter AK	0,17
0,022 g ABTS (Sigma)	Chromogen-	0,50
0,00225 g Na-perhorat (Sigma) (gelöst in 10 ml Citrat- Phosphatpuffer pH = 5,01)	Substrat-Lösung wurde vernachlässigt	0,08
		3,70

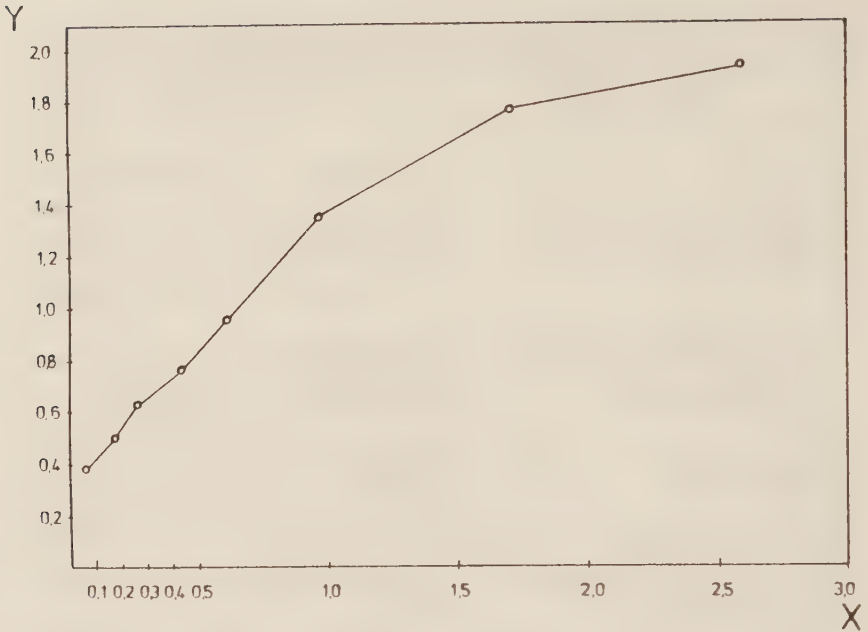


Abb. 31: Standardkurve zur Quantifizierung von Maus IgG

Inkubation einer Polystyrol-Mikrotiter-Platte mit affinitätschromatographisch gereinigtem Maus IgG ($5 \mu\text{g/ml}$), gefolgt von einer Verdünnungsreihe von Maus IgG (Abszisse) und von Peroxidase-markiertem Kaninchen-anti-Maus IgG (Konstante Konzentration). Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen

Chromogen-Substrat-Inkubationszeit: 35 Minuten

X: Maus IgG ($\mu\text{g/ml}$)

Y: O.D. bei 420 nm

puffer und Tween 20, pH 9,6 angefertigt und diejenige Verdünnungsstufe zum Quantifizieren von Maus IgG herangezogen, mit der eine Absorptionshöhe im Meßbereich der Standardkurve erzielt werden konnte.

In Abb. 32 auf Seite 82 ist die Standardkurve für niedrige Konzentrationen von Maus IgG dargestellt. Sie zeigt, daß der Meßbereich dieses ELISA-Testes oberhalb einer Konzentration von 190 pg/ml Maus IgG gewährleistet ist.

4.10. Quantifizierung von Protein AA (AA)

Protein AA wurde als die Hauptkomponente der Amyloidfibrillen-Proteine bei Patienten mit systemischer Amyloidose identifiziert. Protein AA hat ein molekulares Gewicht von 8,5, besitzt β -elektrophoretische Beweglichkeit und stellt ein proteolytisches Derivat eines Akutphasenproteins, des Serumamyloidfibrillen-Proteins A (SAA), dar. Protein AA ergibt mit SAA in der Immundiffusion bei Verwendung von anti-AA Antiseren eine Linie auf Identität.

Zur Quantifizierung von AA soll in dieser Arbeit eine AG-Doppel-AK-Sandwich-Methode des ELISA vorgestellt werden, dessen Durchführung auf Seite 41 erläutert ist. Wie in Abb. 33 (Seite 83) zu ersehen ist, kann AA mit dieser Technik ab einer Konzentration von 50 ng/ml gemessen werden.

4.11. Quantifizierung der leichten Komponente des Serumamyloidfibrillen-Proteins A (SAAL)

4.11.1. Charakterisierung von SAAL

Bei Entzündungskrankheiten ist in vielen Fällen ein Unterschied zwischen dem Ausmaß des klinischen Befundes und der

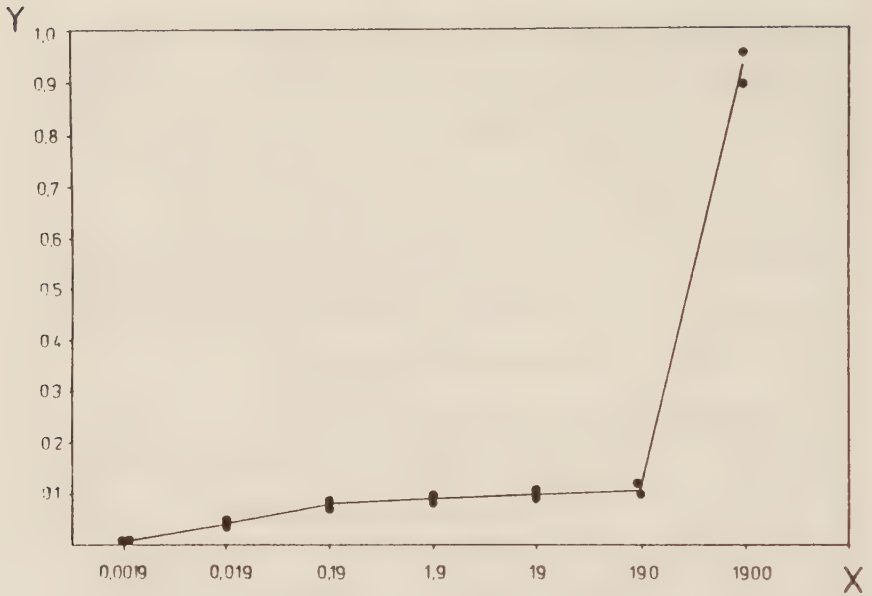


Abb. 32: Bestimmung der Meßgrenze des ELISA zur Quantifizierung von Maus IgG

Testdurchführung siehe Abb. 31

Chromogen-Substrat-Inkubationszeit: 50 Minuten

X: Maus IgG (pg/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

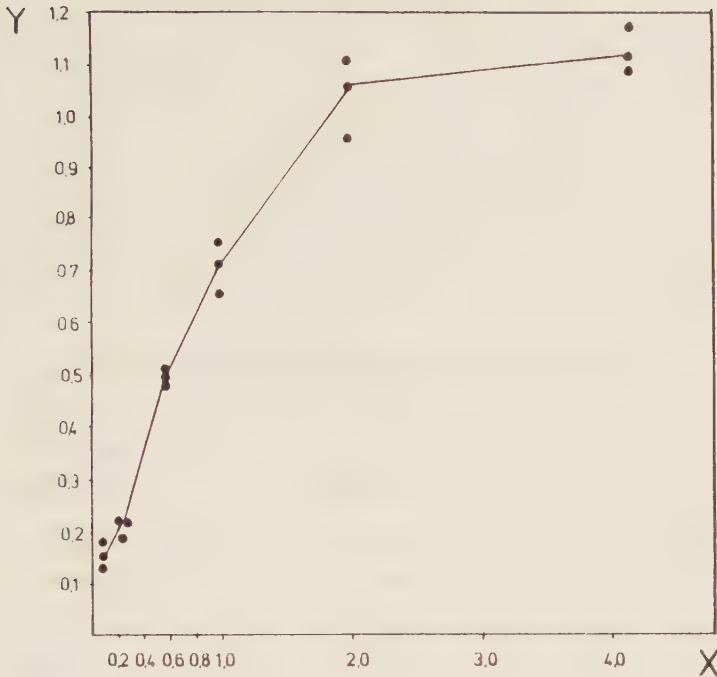


Abb. 33: Standardkurve zur Quantifizierung von AA

Inkubation einer Polystyrol-Mikrotiter-Platte mit Schaf-anti-AA gefolgt von einer Verdünnungsreihe AA, Kaninchen-anti-AA Serum und Peroxidase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen IgG.

Chromogen-Substrat-Inkubationszeit: 40 Minuten.

X: AA (µg/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

Höhe konventioneller Akutphasen-Marker festzustellen. Die labormäßige Objektivierung der Krankheitsaktivität ist jedoch wichtig, um den Krankheitsverlauf verfolgen und den Erfolg therapeutischer Maßnahmen überprüfen zu können. Mit SAAL wurde ein neues Akutphasenprotein erkannt (12, 30, 41, 44, 63), welches in normalen Seren nicht oder in nur geringen Konzentrationen vorliegt, um bei einer Reihe von Entzündungskrankheiten, Tumoren oder Nekrosen anzusteigen.

SAAL ist die niedermolekulare Komponente des Serumamyloids A (SAA; 43), stellt ein polymorphes Protein mit einem Molekulargewicht von 12000 dar (43, 6, 9) und besitzt die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie ein β -Protein (43). SAAL unterscheidet sich von AA in der Immundiffusion durch einen Sporn über AA beim Einsatz von anti-SAAL Antiseren (46).

SAAL wurde bislang mit Hilfe des Radioimmunassays (6, 12, 23, 35, 63, 74), der Radialen Immundiffusion (49) oder des Mikro-ELISA (24, 86) quantifiziert. Die Resultate werden gewöhnlich in AA-Equivalenten (35, 74) oder Units (12, 23) angegeben, da eine exakte Aussage über die Serum-Konzentrationen von SAAL bisher nicht möglich war. In dieser Arbeit soll in einer Doppel-AK-Sandwich-ELISA-Methode SAAL in absoluter Menge (ng/ml) gemessen werden.

4.11.2. SAAL-Konzentrationen in normalen und pathologischen Seren

Eine Standardkurve zur Quantifizierung von SAAL, die mit einer Verdünnungsreihe von gereinigtem SAAL (Seite 22) er-

stellt wurde, soll exemplarisch in Abb. 34 auf Seite 86 dargestellt werden. Danach ist SAAL ab einer Konzentration von etwa 10 ng/ml meßbar. In Abb. 35 auf Seite 87 sind gemessene Werte von SAAL in pathologischen und normalen Seren wiedergegeben. Bei steigendem Verdünnungsgrad der Testseren stiegen die gemessenen Werte für die SAAL-Konzentrationen geringgradig an (Abb. 36, Seite 88).

4.12. Autoantikörper gegen Amyloidfibrillenprotein AA beim Systemischen Lupus erythematosus

4.12.1. Einleitung

Systemischer Lupus erythematosus (SLE) stellt eine Autoimmunkrankheit dar, die charakterisiert ist durch LE-Zellen, Arthritis ohne Deformitäten, Schmetterlingserythem, Raynaud-Phänomen, Alopecie, Photosensibilität, orale oder nasopharyngeale Ulcerationen. Weiterhin, zeigen sich Psychosen, Pleuritis, Pericarditis, Leukopenie, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie. Die renale Schädigung mit ausgeprägter Proteinurie verschlechtert entscheidend die Prognose bei SLE und ist der Hauptgrund für die Sterblichkeit während der ersten fünf Jahre (19).

Ein Hauptmerkmal des SLE ist das Auftreten von Autoantikörpern gegen eine Reihe von zellulären Bestandteilen. Im einzelnen sind zu finden: AK gegen DNA (40, 70, 72, 75, 77), nukleäre Proteine (77), Histone (77) und verschiedene RNA-Proteine (77), AK gegen zytoplasmatische Makromoleküle (77, 84) und β 2-Mikroglobuline (5) und anti-T-Zell Antikörper (56). Die reduzierte Selbsttoleranz besteht anscheinend auf

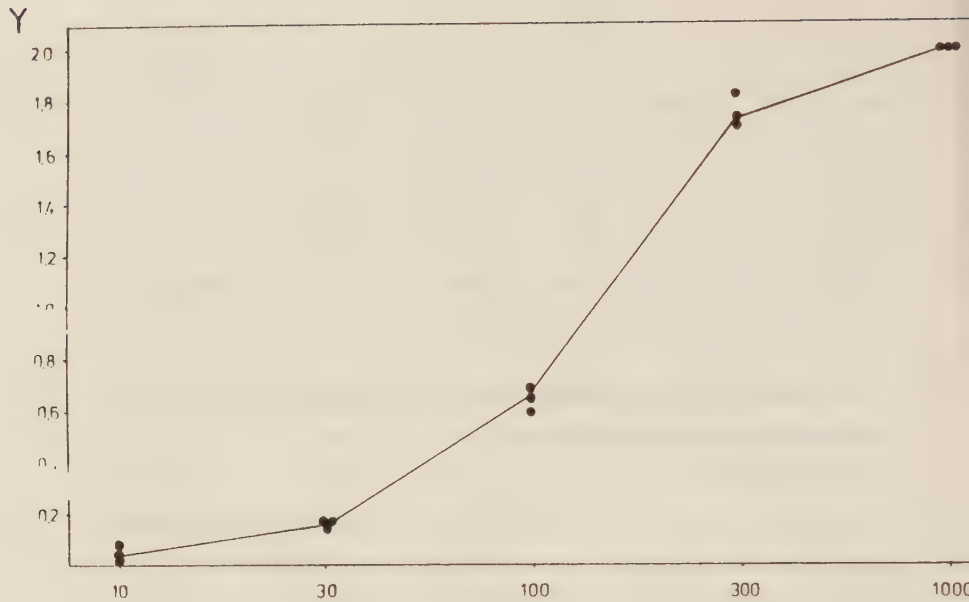


Abb. 34: Standardkurve zur Quantifizierung von SAAL

Inkubation einer Polyvinylchlorid-Mikrotiter-Platte mit Schaf-anti-SAAL, einer Verdünnungsreihe von gereinigtem SAAL und Inkubation von Peroxidase-markiertem Schaf-anti-SAAL.

Chromogen-Substrat-Inkubationszeit: 30 Minuten

X: SAAL (µg/ml)

Y: O.D. bei 420 nm

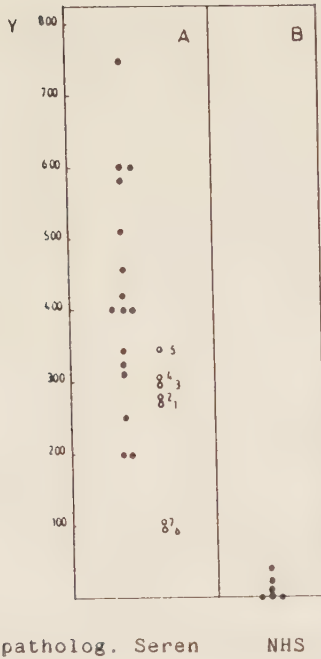


Abb. 35: Konzentrationen von SAAL ($y = \mu\text{g/ml}$) in pathologischen und normalen Humansen (NHS)

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen wie in Abb. 35.
patholog. Seren:

- A = RnA
- B 1,2 = rezidivierende Kniegelenksergüsse
- 3 = M. Still
- 4 = Ovarial-Ca.
- 5 = Idiopathische Amyloidose
- 6,7 = SLE

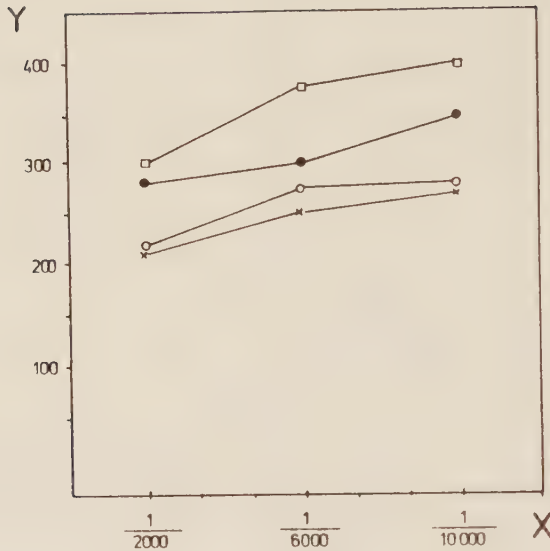


Abb. 36: Quantifizierung von SAAL bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Testseren

In Seren von Patienten mit RhA wurde SAAL quantifiziert. Versuchsbedingungen wie in Abb. 35

● □ ○ x Seren unterschiedlicher Patienten

X = Testserum (Verdünnung)

Y = SAAL ($\mu\text{g/ml}$)

Grund des Verlustes von T-Zell Suppression (64), die zu einer disregulierten B-Zell Aktivität führt (16, 61). Die Autoantikörper selbst werden als Ursache für eine Reihe von Symptomen beim SLE angesehen oder sollen zumindest an deren Entstehen beteiligt sein (77).

In diesem Abschnitt werden Autoantikörper gegen das Amyloidfibrillen-Protein AA beim SLE und deren Quantifizierung vorgestellt.

4.12.2. Anti-AA Aktivität in SLE-Seren

Wie in Abb. 37 auf Seite 90 gezeigt, wurde anti-AA Autoantikörperaktivität in allen 22 untersuchten Seren von Patienten mit SLE mit einem Enzym-Immunoassay nachgewiesen. Im Gegensatz hierzu ließ sich keine anti-AA Aktivität in unselektierten normalen Humanseren finden. Ein Patient mit M. Still und zwei von sieben mit aktiver RhA (C-reaktives Protein + und Blutsenkungsgeschwindigkeit von 30 mm in der ersten Stunde) zeigten anti-AA Aktivität, die jedoch deutlich niedriger als bei jedem SLE-Patienten lag. Keine klinischen Unterschiede konnten bisher bei Patienten mit oder ohne anti-AA Aktivität festgestellt werden. Spezifische Kontrollen wurden durch Hinzufügen von gereinigtem Protein AA zu den Patientenseren durchgeführt. Hierdurch wurde die anti-AA Aktivität bei 6 untersuchten Seren um 80% und mehr gesenkt (Abb. 38, Seite 91).

4.12.3. Identifizierung der AA-bindenden Moleküle

Gamma-elektrophoretische Mobilität konnte bei den AA-bindenden Molekülen in den fünf untersuchten SLE-Seren durch

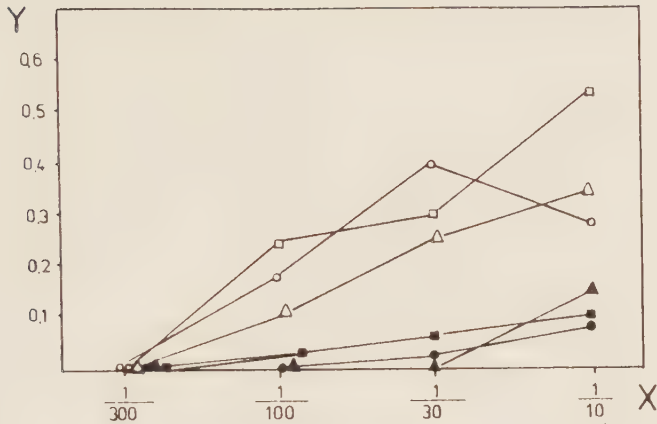


Abb. 38: Hemmung der Auto-Anti-AA Aktivität durch Protein AA in SLE-Seren

In den drei dargestellten Seren wurde die anti-AA Aktivität mit Hilfe des ELISA-Test gemessen.

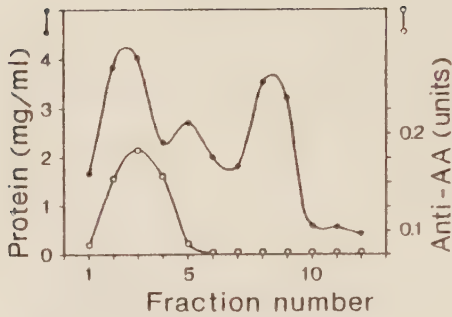
□, ○, △ : unabsorbierte Seren

■, ●, ▲ : mit Protein AA absorbierte Seren (0,01 mg/ml)

Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnitt von Dreifachbestimmungen

X: Serumverdünnung

Y: Auto-anti-AA (units/ml)



IgG	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
TF	-	-	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Alb	-	-	-	-	(+)	(+)	+	+	+	+	-	-	-
PA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Abb. 39: Ladung der AA-bindenden Moleküle

5 ml eines SLE-Serums wurden nach der Ladung mit Hilfe der Zonen-Elektrophorese getrennt. In jeder Fraktion wurden die Proteinkonzentration (Lowry), die anti-AA Aktivität (Mikro-ELISA) und der Gehalt an Immunglobulin G (IgG), Transferrin (TF), Albumin (Alb) und Präalbumin (PA) bestimmt (letztere mit Hilfe der Immundiffusion).

Zonen-Elektrophorese (s.o.) nachgewiesen werden. Ein typisches Beispiel ist in Abb. 39 auf Seite 92 dargestellt, wobei sich ein einziger Gipfel in der Position von IgG zeigt. Nach Trennung eines der untersuchten Seren entsprechend der Größe durch Gelfiltration (s.o.) wurde der Hauptanteil der anti-AA Aktivität in dem zweiten Gipfel gefunden, welcher ebenfalls der Position von IgG entspricht (Abb. 40, Seite 94). Geringe anti-AA Aktivität wurde bei etwas größeren Molekülen in der zweidimensionalen Immundiffusion gefunden, die der Position des IgA entsprechen. Ein Gipfel, kleiner als der von IgG, wurde nicht näher untersucht. Er könnte IgG-Fragmente repräsentieren.

Die durch Affinitätschromatographie (s.o.) mit Hilfe von unlöslichem Protein AA isolierten Proteine aus fünf untersuchten SLE-Seren besaßen alle anti-AA Aktivität, wohingegen das Effluent stets negativ war. Ein Beispiel hiervon ist in Abb. 41, Seite 95 dargestellt. In allen Untersuchungen enthielt die Ammonium-Thiocyanat Elution den Hauptanteil der anti-AA Aktivität. Die eluierten Fraktionen enthielten vorwiegend IgG, wenig IgA, eine Spur IgM, jedoch kein IgD, wie durch Immundiffusion und Immunelektrophorese nachgewiesen wurde. In der Immunelektrophorese erschienen die IgG-Moleküle polyklonal.

4.12.4. Korrelation von anti-AA Aktivität mit klinisch-chemischen Daten

Zwischen der Korrelation von Anti-AA Autoantikörpern (gemessen in Units, s.o.) und der Konzentration von SAAL bei

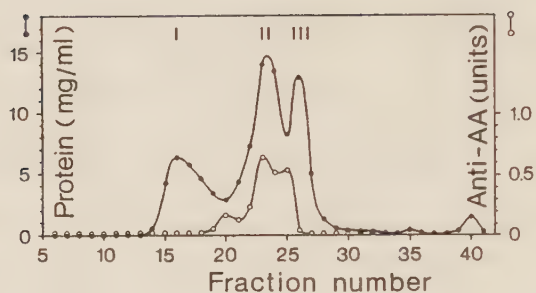


Abb. 40: Größe der AA-bindenden Moleküle

Ein SLE-Serum wurde mit Hilfe der Gelfiltration aufgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde bei O.D. 280 nm und die Anti-AA Aktivität mit Hilfe des Mikro-ELISA für jede Fraktion bestimmt.

I IgM, α_2 Makroglobulin

II IgG

III Albumin

Fraktion 40 repräsentiert die Salzfraktion

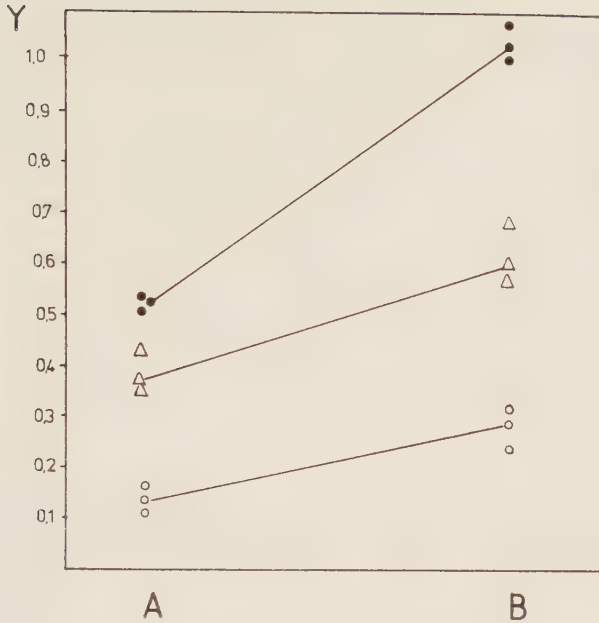


Abb. 41: Aktivität von Auto-Anti-AA Antikörpern isoliert mit Hilfe der Affinitätschromatographie

An Protein AA-Sepharose gebundenes und eluiertes Protein wurde nach anti-AA Aktivität mit Hilfe des ELISA untersucht. Das Ausgangsserum (Δ - Δ) wurde mit dem Effluent ($\times$ - $\times$) und den Eluaten (Glycin-HCl, pH 2,4: ○-○ ; 3M (NH₄)SCN: ●-●) verglichen.

Δ : A = 1/30, B = 1/10 verdünnt

$\times$: A = 1/3, B = unverdünnt

○ : A = 1/30, B = 1/10

● : A = 1/30, B = 1/10

Y : O.D. bei 420 nm

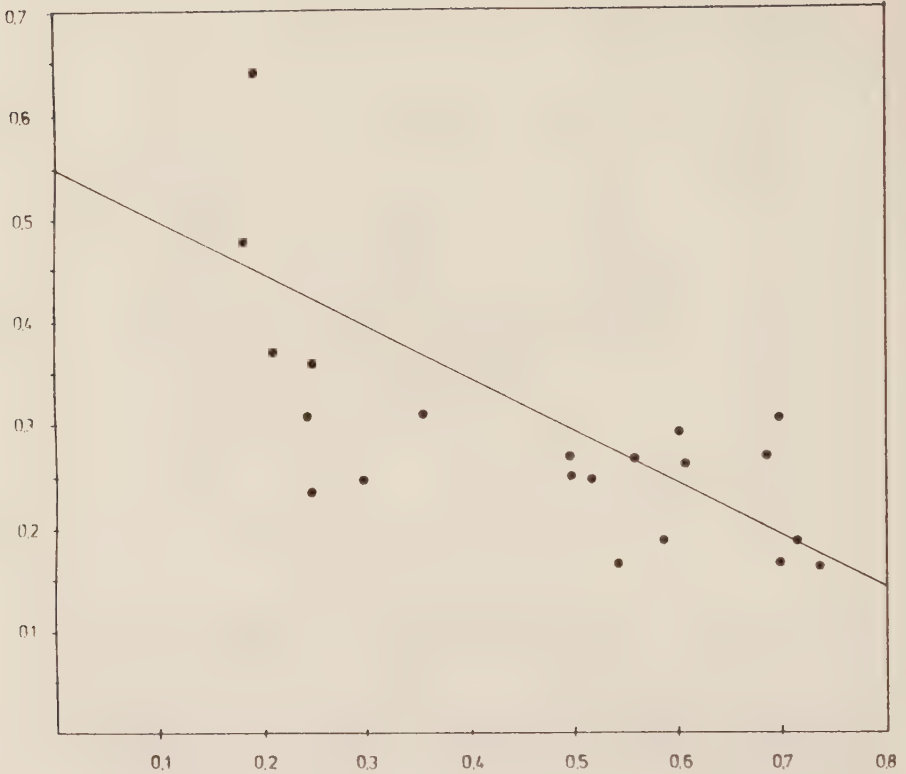


Abb. 42: Korrelation zwischen der Anti-AA Aktivität und der Konzentration von SAAL in 22 SLE-Seren

Die Anti-AA Aktivität und die Höhe der SAAL-Konzentration (Bestimmung siehe unter "Methoden") haben einen negativen Korrelationskoeffizienten von $r = -0,64$ nach der Methode von Bravais-Person (87).

X: SAAL (ng/ml)

Y: Auto-Anti-AA-Aktivität (Units)

den SLE-Seren ergab sich nach der Methode von Bravais-Person (87) ein negativer Korrelationskoeffizient von $\rho = -0,64$ (Abb. 42, Seite 96). Zwischen der Anti-AA Konzentration und dem anti-DNS Titer der SLE-Seren wurde ein Koeffizient von $\rho = 0,50$ errechnet, wie in Abb. 43 auf Seite 98 gemessen und berechnet. Keine signifikante Korrelation konnte zwischen der anti-AA Aktivität und dem anti-ANA Titer, der Leukozyten- oder Thrombozytenzahl, der Konzentration von Komplement C3 oder C4 und der Blutsenkungsgeschwindigkeit ermittelt werden.

5. DISKUSSION

5.1. Praktische Aspekte beim Erstellen eines ELISA-Testes

So einfach das Meßprinzip der ELISA-Methode erscheint, so schwierig gestaltet sich ihre Erstellung bis zur praktischen Einsetzbarkeit. Das ELISA-Testsystem reagiert äußerst empfindlich auf alle äußeren Einflüsse, wie dem individuell unterschiedlichen Handhaben der Platten, dem Durchführen des Waschvorganges, und dem Pipettieren. Reproduzierbarkeit der Meßwerte kann nur durch exaktes, gleichartiges Arbeiten erreicht werden. Nicht zuletzt sind aus diesem Grund vollautomatische ELISA-Anlagen beim Einsatz der ELISA-Methode in der Routinediagnostik unumgänglich.

Die in einem ELISA-Test erhaltenen Absorptionswerte stellen keine Absolutwerte dar. Nullwerte, Kontrollwerte und eine Standardkurve müssen auf jeder Mikrotiter-Platte ermittelt werden. Bei den hier durchgeführten Messungen lag der Quotient für die Reproduzierbarkeit bei $r > 0,88$.

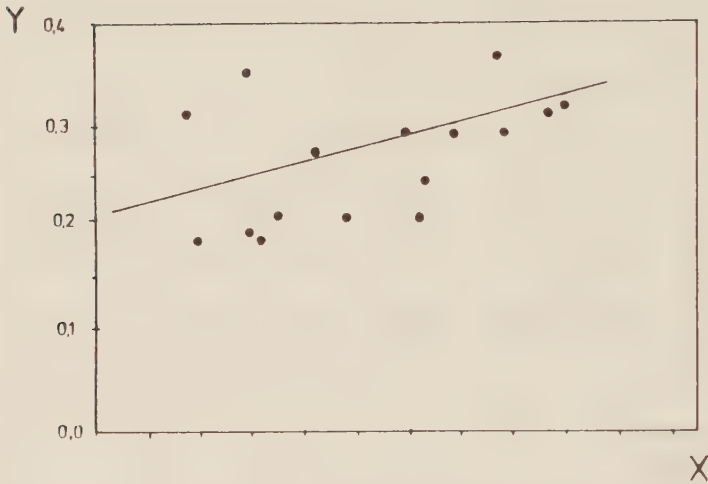


Abb. 43: Korrelation zwischen der Anti-AA Aktivität und dem anti-DNS Titer von 16 SLE-Seren

Die anti-AA Aktivität und der anti-DNS Titer (Bestimmung siehe "Methoden") ergaben einen Korrelationskoeffizienten von $\rho = 0,50$ entsprechend der Methode von Bravais-Person (87).

X: Anti-DNS-Titer (1/10n)

Y: Auto-Anti-AA-Aktivität (Units)

Bei dem Radioimmunoassay liegt der Korrelationskoeffizient in der Regel bei $r > 0,90$ (8, 14, 21, 32, 39, 52, 54) bei der Hämagglutinationshemmung bei $r > 0,80$ (79, 81) und bei der Komplementfixationstechnik bei $r = 0,84$ (81). Bei Mehrfachbestimmungen ($n = 3$) lagen die Meßschwankungen im Bereich von $\pm 10\%$. Die feste Phase, das Blockmittel und die immunkompetenten Reaktionslösungen beeinflussen sich gegenseitig und müssen miteinander in Einklang gebracht werden. Sämtliche Parameter sind daher für jeden neu zu erstellenden ELISA aufeinander abzustimmen.

5.2. Auswahl der Platten

Die auf dem Markt erhältlichen Mikrotiter-Platten können nicht unüberprüft als feste Phase des ELISA eingesetzt werden. Mikrotiter-Platten zweier Firmen (Nunc, Wiesbaden, F.R.G.; Flow, Meckenheim, F.R.G.) besaßen keine oder nur sehr geringe Proteinbindungsfähigkeit. Unterschiedliche Chargen und Präparationen einer Charge der in dieser Arbeit verwendeten Mikrotiter-Platten der Firma Dynatech (Plochingen, F.R.G.) waren in ihrer Bindungsfähigkeit recht unterschiedlich. Es ist daher ratsam, sich Platten einer Charge und eines Präparationsvorganges zu besorgen.

Polystyrol und Polyvinylchlorid waren als feste Phase für unterschiedliche ELISA-Methoden einsetzbar. So erwies sich Polyvinylchlorid als feste Phase für die Enzym-Inhibitions-, die Doppel-AK-Sandwich- und die AG-AK-Sandwich-Methode, Polystyrol für die AG-Doppel-AK-Sandwich-Methode als geeignet. Bei der AG-Doppel-AK-Methode, bei der an das adsor-

bierte Immunglobulin noch 3 weitere Reaktanten zu binden haben, fallen gebundene Immunkomplexe bei ungeeigneten Konzentrationen im Verlauf des ELISA-Testes von der PVC-Platte wieder ab. In diesem Falle (PVC-Platte) können daher niedrigere Adsorptionswerte resultieren als auf der Polystyrol-Platte, die zwar weniger Protein adsorbiert, deren gebundene Immunkomplexe aber in größerem Umfang gebunden bleiben. Die durchgeführte ELISA-Methode wird daher wesentlich durch die Wahl des Plattenmaterials bestimmt.

5.3. Auswahl des Chromogens

ABTS wurde als Chromogen für die hier durchgeführten ELISA-Tests gewählt, da hiermit im Gegensatz zu anderen Chromogenen auch mit sehr niedrigen Konzentrationen an Peroxidase positive Absorptionsausschläge erzielt werden konnten. Ein weiterer Vorteil: ABTS ist nicht lichtempfindlich und in den die Absorptionshöhe bestimmenden oxidierten Formen stabil. Daher bleiben die Meßwerte auch noch über längere Zeit unverändert. (Nach 24 Stunden wurde lediglich ein minimaler Abfall des Absorptionsmaximums gemessen). Bei der Auswahl des Chromogens ist ferner zu beachten, daß die meisten giftig sind. So reizen z.B. Phenylendiamine Haut und Schleimhäute und bilden Ekzeme. In den Organismus gelangt, rufen sie Zyanosen und Leberschädigungen hervor (29). Gesundheitsbeeinträchtigende Wirkungen von ABTS wurden in der Literatur bisher nicht aufgeführt.

5.4. Spezifität des ELISA

Die Spezifität des ELISA-Tests hängt von der immunologischen

Reinheit der einzelnen Reaktanten ab. In den hier durchgeführten ELISA-Tests wurden daher stets affinitätschromatographisch gereinigte AK und AG verwendet, deren Spezifität in der zweidimensionalen Immundiffusion oder der Immunelektrophorese überprüft wurden. Die Meßergebnisse im ELISA können aber auch bei Vorliegen spezifischer Reaktanten durch Kreuzreaktionen verfälscht werden (7, 79, 80). Wie im RIA können Seren- und Plasmakomponenten mit der immunologischen Reaktion interferieren, wobei beim ELISA durch die enzymatische Reaktion eine zusätzliche Beeinflussung möglich ist. Das einfachste Mittel, den Beeinflussungsfaktor der Testlösung möglichst gering zu halten, besteht in der Verdünnung der Testlösung, wobei nach Schuurs und Van Weemen (71) ein Verdünnungsgrad von 1/10 ausreicht. Zusätzlich können extrem hohe Konzentrationen der zu messenden Immunglobuline falsch negative Werte ergeben (53). So zeigte der ELISA-Test zum Messen von Auto-anti-AA AK bei einigen Proben ein Abfallen der Absorptionswerte bei einer Verdünnung von 1/10. Die hier aufgeführten Meßwerte wurden daher bei einem Verdünnungsgrad von $\geq 1/30$ durchgeführt. Um mögliche Kreuzreaktionen noch weiter herabzusetzen, wurden die Testlösungen und der Peroxidase-markierte AK mit 0,05% Tween 20, einem Polyoxyäthylen-Sorbitan-Monolaurat, versetzt.

5.5. Methoden der Enzymkopplung

Um die Güte der einzelnen Enzymkopplungen zu testen, wurden diese in der indirekten Immunperoxidase-Technik und im ELISA eingesetzt. Hierbei konnten die nach der NaJO_4 -Methode her-

gestellten und die von Fa. Miles (Frankfurt) erworbenen Enzymkopplungen in weit höherer Verdünnung eingesetzt werden, als die nach der GDA-Methode hergestellten Präparationen (Ein Präparat der Fa. Behring (Marburg) war in der indirekten Immunperoxidase-Technik nicht zu verwenden und wurde daher in der ELISA-Technik nicht eingesetzt). Die getesteten Peroxidase-Kopplungen wiesen ein ganz unterschiedliches Verhältnis von IgG zu HRP auf, und zwar von 0,49 bis 3,50. Die in hoher Verdünnung einsetzbaren Kopplungen zeigten ein optimales molares Verhältnis von Ig zu HRP zwischen 0,77 und 1,19 auf. Präparationen mit einem Verhältnis von 2,30 und 3,58, die nach der GDA-Methode durchgeführt worden waren, konnten in nur wesentlich konzentrierterer Form eingesetzt werden, wohl deshalb, weil ein großer Teil der Antikörperaktivität durch die Kopplung verloren gegangen war.

Die Fähigkeit, HRP an IgG zu binden, war bei den einzelnen Kopplungsmethoden ebenfalls ganz unterschiedlich. Hierbei war die modifizierte NaJO_4 -Methode mit 46,3% und 66,5% gebundener Menge HRP der GDA-Methode mit 14,4%, 29,4% und 37,6% ebenfalls überlegen. Bei der nicht modifizierten NaJO_4 -Methode, die im Unterschied zu der modifizierten NaJO_4 -Methode unter Verwendung von FDNB durchgeführt wurde, lag der gebundene Anteil von HRP nur bei 16,4%.

5.6. ELISA als Routinetest in der klinischen Labordiagnostik

Es wird in dieser Arbeit gezeigt, daß sich die ELISA-Technik auf Grund einfacher, umweltfreundlicher Handhabung und nie-

driger Versuchskosten als Routinetest zur Quantifizierung von Proteinen in der klinischen Labordiagnostik anbietet. Bei der Quantifizierung von Maus IgG wird exemplarisch die Sensibilität der ELISA-Technik aufgezeigt, die es ermöglicht, Immunglobulin ab einer Konzentration von 1,9 ng/ml zu quantifizieren. Als mögliche Standardverfahren werden die ELISA zur Quantifizierung von Protein AA ab einer Konzentration von 130 ng/ml und von SAAL ab einer Konzentration von 10 ng/ml vorgestellt. Die ELISA-Technik wird in dieser Arbeit auch zum Nachweis und zur Quantifizierung von Autoantikörpern in SLE gegen das Amyloidfibrillenprotein AA eingesetzt. Die Bestimmungen erfolgten hierbei sowohl in Patientenserum, als auch in den verschiedenen Fraktionen der biochemischen Auftrennungsvorgängen.

5.7. Bedeutung von Autoantikörpern in SLE gegen Protein AA

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal der Nachweis von Autoantikörpern gegen Protein AA erbracht. Auto-Anti-AA AK wurden in hoher Konzentration in Serum von Patienten mit SLE und mit niedrigem Titer in einigen Serum von Patienten mit RHA nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten diese Autoantikörper nicht bei gesunden Blutspendern identifiziert werden. Die AA-bindenden Moleküle zeigten in der Zonen-Elektrophorese γ -elektrophoretische Mobilität und konnten mit Hilfe der Gelfiltration zusammen mit IgG in der 150 kd Fraktion eluiert werden. Diese AK banden vollständig an Sepharose-Protein AA. Anschließend konnten sie eluiert und in relativ reiner Form direkt nachgewiesen werden. Die Identifizierung

der Auto-AK als Immunglobuline gelang mit Hilfe isotyp-spezifischer Antiseren in der zweidimensionalen Immundiffusion und Immunelektrophorese. Entsprechend anderen Auto-AK bei SLE sind diese AK polyklonalen Ursprungs und stellen einen Mischtyp dar zwischen IgA, mit IgG im Überschuß und mit Spuren von IgM.

Die Inzidenz der Auto-anti-AA AK wurde bei Patienten zweier Entzündungskrankheiten mit intermittierend auftretenden Akutphasen und mit unterschiedlichem Grad an generalisierter Amyloidose untersucht. Bei SLE mit einem äußerst niedrigen Grad an Amyloidose (38) wurde in allen untersuchten Seren ein hoher Titer der Auto-anti-AA Ak gefunden. Im Gegensatz hierzu lagen bei RHA mit der hohen Amyloidoserate von 6-15% (42, 78) gar keine der AK oder diese nur in niedrigem Titer vor. Diese unterschiedliche Korrelation zeigte sich ebenfalls hinsichtlich der SAAL-Konzentration. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß diese Auto-AK in einem Zusammenhang mit dem niedrigen Grad an generalisierter Amyloidose zu sehen sind. Wenn diese Vermutung als bewiesen dastehen sollte, würden diese nachgewiesenen AK zu der kleinen Gruppe der gutartigen Auto-AK gehören. Zusätzlich könnten diese Auto-AK diagnostische, prognostische und therapeutische Bedeutung gewinnen, nicht nur bei SLE, sondern auch bei einer Reihe von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, die mit einer Amyloidose vom AA-Typ einhergehen.

6. LITERATUR

1. Avrameas, S. u. B. Guilbert: Immunologie, C. R. Acad. Sc. Paris 273, 2705-2707, 1971.
2. Avrameas, S. u. T. Ternyuck: Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. Immunochem. 8, 1175-1179, 1971.
3. Avrameas, S. u. B. Guilbert: Enzyme-immunoassay for the measurement of antigens using peroxidase conjugates. Biochimie 54, 837-842, 1972.
4. Axen, R., J. Porath u. S. Ernback: Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature 214, 1302-1304, 1967.
5. Bahr, G.M., G.A.W. Rook, E. Moreno, P. M. Lydyard, F. Z. Modabber u. J.L. Stanford: Use of the ELISA to screen for anti-thymocyte and anti- δ 2-micro-globulin antibodies in leprosy and SLE. Immunol. 41, 865-873, 1980.
6. Baussermann, L.L., P.N. Herbert u. K.P.W.J. McAdam: Heterogeneity of human serum amyloid A proteins. J. exp. Med. 152, 641-656, 1980.
7. Bastiani, R.J., R.C. Phillips, R.S. Schneider u. E.F. Ullman: Immunochemical drug assay. Amer. J. Med. Tech. 39, 211-216, 1973.
8. Belanger, L., D. Hamel, D. Dufour u. M. Pouliot: Double-antibody enzyme immunoassay. Clin. Chem. 22/2, 198-204,

1976.

9. Benditt, E.P., N. Erikson u. R.H. Hanson: Amyloid protein SAA is an apoprotein of mouse plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4092-4096, 1979.
10. Benditt, E.P., A.S. Cohen, P.P. Costa, E.C. Franklin, G. Glenner, G. Husby, E. Mandema, J.B. Natvig, E.F. Osserman, E. Sohar, O. Wegelius u. P. Westermark: Guidelines for nomenclature. In: *Amyloid and Amyloidosis*, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, pp. 11-12, 1980.
11. Benditt, E.P., N. Erikson u. M.A. Hermodson: The major proteins of human and monkey amyloid substance: common properties including unusual N-terminal amino acid sequences. *FEBS Lett.* 19, 169-173, 1971.
12. Benson, M.D. u. A.S. Cohen: Serum amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic and neoplastic diseases. *Arthritis Rheum.* 22/1, 36-42, 1979.
13. Bidwell, D.E., A.A. Buck, H.J. Diesfeld, B. Enders, J. Haworth, G. Huldt, N.H. Kent, C. Kirsten, P. Mattern, E.J. Ruitenberg u. A. Vollar: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. World Health Organ.* 54, 129-139, 1976.
14. Bosch, A.M.G., H. van Hell, J.A.M. Brands, B.K. van Weemen u. A.H.W.M. Schuurs: Pregnancy monitoring with

- enzyme-immunoassays for human placental lactogen and total oestrogens. *Z. Anal. Chem.* 279, 143, 1976.
15. Bout, D., A. Capron, J.C. Dugimont u. J. Fruit: Application of immunoenzyme methods in diagnosis of human parasitic diseases. *Ann. NY Acad. Sci.* 254, 331, 1975.
 16. Budman, D.R., E.B. Merchant, A.D. Steinberg, B. Dof, M.E. Gershwin, E. Lizzio u. J.P. Reeves: Increased spontaneous activity of antibody forming cells in the peripheral blood of patients with active SLE. *Arthritis Rheum.* 20, 823-829, 1977.
 17. Bull, B.S., M.A. Schneidermann u. G. Brecher: Platelet counts with the coulter counter. *Am. J. Clin. Path.* 44 (6), 678-688, 1965.
 18. Chang, J.Y., D. Bauer u. B. Wittmann-Liebold: Microsequence analysis of peptides and proteins using 4-NN-dimethylamino-azobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Lett.* 93, 205-214, 1978.
 19. Cohen, A. u. J.J. Canosa: Criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 15, 540-542, 1972.
 20. Cohen, A.S., E.C. Franklin, G.G. Glenner, J.B. Natvig, E.F. Osserman u. O. Wegelius: Nomenclature. In: *Amyloidosis 5*, Academic Press, New York, San Francisco and London, p. 9, 1976.

21. Comoglio, S. u. F. Celada: An immuno-enzymatic assay of cortisol using E. Coli β -galactosidase as label. J. Immunol. Meth. 10, 161-170, 1976.
22. Cuatrecasas, P.: Protein purification by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 245, 3059-3067, 1970.
23. De Beer, F.C., R.F. Dyck u. M.B. Pepys: Solid-phase immunoradiometric assay for serum amyloid A protein using magnetisable cellulose particles. J. Immunol. Meth. 54, 213-221, 1982.
24. Doepel, F.M., J.C. Glorioso, C.E. Newcomer, M. Skinner u. G.D. Abrams: Enzyme-linked immunosorbent assay of serum protein SAA in rhesus monkeys with secondary amyloidosis. Lab. Invest. 45, 7-13, 1981.
25. Engvall, E. u. P. Perlmann: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. J. Immunol. 109, 129-135, 1972.
26. Engvall, E. u. P. Perlmann: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobuline G. Immunochem. 8, 871-874, 1976.
27. Engvall, E. u. I. Ljungström: Detection of human antibodies to *Trichinella Spiralis* by enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. Acta path. microbiol. Scand. Sect. C 83, 231-237, 1975.
28. Eulitz, M. u. R.P. Linke: Primary structure of favourable part of an amylogenic bence-jones-protein (MEV). An

- unusual insertion in the third hyper variable region of a human kappa-immunoglobulin light chain. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1347-1358, 1962.
29. Eulitz, Ch., S. Scheuermann, H.-J. Thier: ABC Chemie Verlag Harri Dentich, Frankfurt/Main, 1976.
30. Glenner, G.G.: Amyloid deposits and amyloidosis. The β -fibrillosis. N. Engl. J. Med. 302, 1283-1292, 1333-1343. 1980.
31. Hirata, F., R. Carmine, C.A. Nelson, J. Axelrod, E. Schiffmann, A. Warabi, A. de Blas, M. Nirenberg, V. Manganiello, M. Vaughan, S. Kumagai, I. Gree, J.L. Dekker u. A.D. Steinberg: Presence of autoantibody for phospholipase inhibitory protein lipomodulin in patients with rheumatic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3190-3194, 1981.
32. Hoffman, D.R.: Estimation of serum IgE by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Allergy Clin. Immunol. 51, 303-307, 1973.
33. Holbert, S.P. u. M. Anken: Detection of hepatitis B surface antigen (HBsAG) with use of alkaline phosphatase labelled antibody to HBsAG. J. Infect. Dis. Supplement 136, 318-323, 1977.
34. Hamaguchi, Y., K. Kato, H. Fukui, I. Ishikawa, S. Okawa, E. Ishikawa, K. Kobayashi u. N. Karubuma: Enzyme-linked sandwich immunoassay of macromolecular antigen using the

- rabbit antibody coupled glass rod as a solid phase. Eur. J. Biochem. 71, 459-467, 1976.
35. Ignaczak, T.F., J.D. Sipe, R.P. Linke u. G.G. Glenner: Immunochemical studies on the nature of the serum component (SAA) related to secondary amyloidosis. J. Lab. clin. Med. 89, 1092-1104, 1978.
36. Kato, K., Y. Hamaguchi, S. Okawa, E. Ishikawa, K. Kobayashi, u. N. Katunuma: Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and amino-alkylsilyl glass surface for the enzyme linked sandwich assay. J. Biochem. 82, 261-266, 1977.
37. Kindmark, C.O.: The concentration of C-reactive protein in sera from healthy individuals. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29, 407-411, 1972.
38. King, R.W. u. W.F. Falls, Jr: Renal amyloidosis: development in a case of systemic lupus erythematosus. Clin. Nephrol. 6, 497-499, 1976.
39. Kleinhammer, G., H. Lenz, R. Linke u. W. Gruber: Determination of serum insulin by solid enzyme immunoassay in antibody coated tubes. Z. Anal. Chem. 279, 145, 1976.
40. Koeffler, D., V. Agnello, R. Carr u. H. Kunkel: Anti-DNA antibodies and renal lesions of patients with systemic lupus erythematosus. Transplant. Proc. 1, 933-938, 1969.

41. Kusher, I., H. Gewurz, u. M.D. Benson: C-reactive protein and the acute phase response. J Lab. clin. Med. 97, 739-749, 1981.
42. Kyle, R.A. u. E.D. Bayrd: Amyloidosis: Review of 236 cases. In: Medicine 54, Baltimore, pp. 271-299, 1975.
43. Linke, R.P., J.D. Sipe, P. Pollock, Th. F. Ignaczak u. G. Glenner: Isolation of a low-molecular-weight serum component antigenically related to an amyloid fibril protein of unknown origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1473-1476, 1975.
44. Linke, R.P., G. König, u. S. Goethe: Serum amyloid protein SAA: structure antigenic features and correlation to other acute phase measures in rheumatoid arthritis. In: Disease evaluation and patient assessment in rheumatoid arthritis (T.E.W. Felkamp u. J.K. van der Kost, Eds.) Stafleu's Scient. Publ. Comp., Alphen aan den Rijn/ Brussel, pp. 127-138, 1979.
45. Linke, R.P.: The Amyloids: Pathologic fibrillar proteins and old age. In: Conference on structural pathology in DNA and the biology of ageing. Jahreskonferenz der DFG 1979, Freiburg, Harald Boldt Verlag, Boppard, pp. 193-204, 1980.
46. Linke, R.P.: Immunochemical investigations on serum amyloid A (SAA). Temperature induced changes of its quaternary structure. In: Amyloid and Amyloidosis (G. G.

- Glenner, P.P. Costa u. F. de Frietas, Eds.) Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, Princeton, pp. 313-319, 1980.
47. Linke, R.P. u. W.B.J. Nathrath: Klassifizierung von Amyloid-Krankheiten an der Biopsie. Münch. med. Wschr. 122/2, 1772-1777, 1980.
48. Linke, R.P.: Amphiphilic properties of the low molecular weight component of serum amyloid protein shown by charge-shift electrophoresis. Biochem. Biophys. Acta 668, 388-396, 1981.
49. Linke, R.P.: Immunhistochemical identification and cross reactions of amyloid fibril proteins in senile heart and amyloid in familial polyneuropathy. Lack of reactivity with cerebral amyloid in Alzheimer's disease. Clin. Neuropathol. 1, 172-182, 1982.
50. Linke, R.P., K.L. Heilmann, W.B.J. Nathrath u. M. Eulitz: Identification of amyloid-A protein in a sporadic Muckle-Wells syndrome. N-terminal amino acid sequence after isolation from formalin fixed tissue. Lab. Invest. 48, 698-704, 1983.
51. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr u. R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-268, 1951.
52. Maiolini, R. u. R. Masseyeff: A sandwich method of enzymimmunoassay. Application to rat and human alpha-fetoprotein. J. Immunol. Meth. 8, 223-234, 1975.

53. Miles, L.E.M. u. C.N. Hales: Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature* 219, 186-189, 1968.
54. Miyai, K., K. Ishibashi u. Y. Kumahara: Enzyme-linked immunoassay of thyrotropin. *Clin. Chim. Acta* 67, 263-268, 1976.
55. Moncada, B., N.K.B. Day, R.A. Good u. D.B. Windhorst: Lupus erythematosus-like syndrome with a familial defect of complement. *New. Engl. J. Med.* 286, 698-693, 1972.
56. Morimoto, C., E.L. Reinherz, T. Abe, M. Homma u. S.F. Schlossman: Characteristics of anti-T-cell antibodies in systemic lupus erythematosus: Evidence for selective reactivity with normal suppressor cells defined by monoclonal antibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 16, 474-484, 1980.
57. Müller-Eberhard, H.J.: A new supporting medium for preparative electrophoresis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 12, 33-37, 1960.
58. Nakane, P.K. u. G.B. Pierce: Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14, 929-931, 1966.
59. Nakane, P.K. u. M. Kawaoi: Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084-1091, 1974.

60. O'Bierne, A. u. H.R. Cooper: Heterogeneous enzyme immunoassay. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1148-1162, 1979.
61. Okudaira, K., K. Tanimoto, T. Nakamura u. Y. Horjuchi: Spontaneously enhanced in vitro immunoglobulin synthesis by B cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 16, 267-278, 1980.
62. Ouchterlony, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Prog. Allergy*, 6, 30-154, 1962.
63. Rosenthal, C.J. u. E.C. Franklin: Variation with age and disease of an amyloid A protein-related serum component. *J. Clin. Invest.* 55, 746-753, 1975.
64. Rosenthal, C.J. u. E.C. Franklin: Depression of cellular-mediated immunity in systemic lupus erythematosus. Relation to disease activity. *Arthritis Rheum.* 18, 207-217, 1975.
65. Rosenthal, A.F., M.G. Vargas u. C.S. Klass: Evaluation of enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT) for determination of serum digoxin. *Clin. Chem.* 22, 1899-1902, 1976.
66. Ruitenberg, E.J., I. Ljungström, P.A. Steerenberg: Application of immunofluorescence and immunoenzyme methods in the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infection. *Ann. NY Acad. Sci.* 254, 296-303, 1975.

67. Scheidegger, J.J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 7, 103-110, 1955.
68. Scheinberg, M.A., A. Masuda, M.D. Benson u. N.F. Mends: Serum amyloid protein SAA, C-reactive protein and lysozyme in leprosy. *Intern. J. Leprosy* 47, 133-137, 1979.
69. Scheinberg, M.A., O. Hubscher, D. Garcia Morteo u. M.D. Benson: Serum amyloid protein levels in South American children with rheumatoid arthritis. A cooperative study. *Ann. Rheum. Dis.* 39, 228-230, 1980.
70. Scher, P. u. J. Sandson: Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *New. Engl. J. Med.* 278, 533-538, 1968.
71. Schuurs, A.H.W.M. u. B.K. van Weemen: Enzyme-Immunoassay *Clin. Chim. Acta* 81, 1-40, 1977.
72. Seymour, P.H., J. Karsh u. M. Anken: Studies on autoantibodies to deoxyribonucleic acid and deoxyribonucleoprotein with enzyme-immunoassay (ELISA). *J. Lab. Clin. Med.* 97/1, 97-111, 1981.
73. Shapiro, A.L., E. Viñuela u. J.V. Maizel, Jr.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 815-820, 1967.

74. Sipe, J.D., T.F. Ignaczak, P. Scott Pollack u. G.G. Glenner: Amyloid fibril protein AA: Purification and properties of the antigenically related serum component as determined by solid phase radioimmunoassay. J. Immunol. 116, 1151-1156, 1976.
75. Stollar, B.D. u. M. Papalian: Secondary structure in denatured DNA is responsible for its reaction with alternative DNA antibodies of systemic lupus erythematosus sera. J. Clin. Invest. 66, 210-219, 1980.
76. Takao, H., H. Hiroshi, S. Yuichi, I. Masao, N. Yoshitaka, K. Masataka, O. Yukiko u. O. Ko: Antiglycolipid autoantibody detected in the sera from systemic lupus erythematosus patients. J. Clin. Invest. 66, 1437-1440, 1980.
77. Thomas, T. u. M.D. Provost: Subsets in systemic lupus erythematosus. J. Invest. Dermat. 72, 110-113, 1979.
78. Triger, D.R. u. A.M. Joehef; Renal amyloidosis - a fourteen-year follow-up. Quart. J. Med. 42, 15-40, 1973.
79. Van Weemen, B.K. u. A.H.W.M. Schuurs: Immunoassay using antibody-enzyme conjugates. FEBS Lett. 43, 215-218, 1974.
80. Voller, A. u. D.E. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to Rubella, Br. J. exp. Path. 56, 338-339, 1975.

81. Voller, A., D.E. Bidwell u. A. Bartlett: Microplate enzyme-immunoassay for the immunodiagnosis of virus infections. Manual of Clinical Immunology. Ann. Soc. Microbiol. 506-512, 1976.
82. Voller, A., D.E. Bidwell u. A. Bartlett: ELISA techniques in virology. Lab. Res. Methods Biol. Med. 5, 59-81, 1982.
83. Waricek, C.A. u. M. Reichlin: Clinical and serological differences between systemic lupus erythematosus patients with antibodies to Ro versus patients with antibodies to Ro and La. J. Clin. Invest. 69, 835-843, 1982.
84. Westergren, A.: Über die Stabilitätsreaktion des Blutes, nebst Vergleichswerten bei verschiedener Methodik. Klin. Wschr. 1/2, 1359-1360, 1922.
85. Wilson, M., J. Fried, R.M. McQuay u. A.J. Sulzer: Evaluation of the indirect immunofluorescence and complement fixation tests for the serodiagnosis of schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hgg. 26, 1159-1163, 1977.
86. Wood, D.D., M. Gammon, u. M.J. Staruch: An ELISA assay for murine amyloid A and serum amyloid A utilizing monoclonal antibodies. J. Immunol. Meth. 55, 19-26, 1982.
87. Yamane, T.: Statistik - Ein einführendes Lehrbuch I, Fischer Taschenbuch, Frankfurt/Main, pp. 391-409, 1976.

7. DANKSAGUNG

Vor allem danke ich Herrn Priv.Doiz.Dr.med. R.P. Linke für seine stets gewährte Hilfe in der Planung, Durchführung und Abfassung der vielen experimentellen Arbeiten, die für das Erstellen der vorliegenden Dissertation unerlässlich waren. Auch danke ich seinen Mitarbeiterinnen Fr. Linke, Frl. Tübel und Frl. Wegscheider für die hilfreiche praktische Unterstützung.

Herrn Prof.Dr.med.Dr.rer.nat. F. Schwarzfischer danke ich für die Betreuung und Durchsicht meiner Arbeit.

Ferner danke ich der Deutschen Forschungsgesellschaft, die über den Forschungsschwerpunkt "Biologie des Alterns" im Teilprojekt Li 247/6-4 und über den Sonderforschungsbereich 207 "Grundlagen und klinische Bedeutung der extrazellulären limitierten Proteolyse" im Teilprojekt C 6 großzügig finanzielle Mittel bereitgestellt hat.

Des weiteren danke ich Herrn Prof.Dr.med. G. Riethmüller für die Möglichkeit der Arbeit am Institut für Immunologie der Universität München.

Frau Montana danke ich für die Reinschrift dieser Dissertation.

8. LEBENSLAUF

- 25.10.52 Geburt in Günzburg als 4. von 5 Söhnen des Ehe-
paares Karl und Marianne Stolle
- 1959-63 Volksschule in Günzburg
- 1963-72 Gymnasium in Günzburg mit Reifeprüfung
- 1972-77 Studium der Chemie und Biologie an der Universität
München
- 21.12.77 Staatsexamen für das Höhere Lehramt in Chemie und
Biologie
- 1978-83 Studium der Medizin an der Universität München
- 28.4.83 Staatsexamen für Medizin
- 19.5.83 Approbation
- 29.8.84 Promotion zum Dr.med. bei Prof. Dr.med. J. Probst
an der Technischen Universität München
- 1983-84 Assistenarzt auf der Chiurgischen Abteilung des
Kreiskrankenhauses Tirschenreuth
- seit 1984 Assistenarzt auf der Inneren Abteilung des Kreis-
krankenhauses Krumbach

